

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. K. Meßmer

**Analyse**  
**der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion**  
**bei hepatischer Ischämie-Reperfusion**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Andrej Khandoga  
aus Mosty/Weißrussland  
2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. F. Krombach
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. J. Duhm Prof. Dr. D. Inthorn Prof. Dr. L. J. Wurzinger
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. P. Biberthaler
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	11.07.2002

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>6</b>
1.1. BEDEUTUNG VON ISCHÄMIE-REPERFUSION IN DER LEBERCHIRURGIE .....	6
1.2. ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN .....	7
1.2.1. "No-reflow"- Phänomen .....	7
1.2.2. "Reflow"-Paradox .....	8
1.2.3. Beteiligung von Thrombozyten am I/R-Schaden .....	10
<b>2. ZIELSETZUNG</b> .....	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>16</b>
3.1. VORBEMERKUNGEN .....	16
3.2. MODELL .....	16
3.2.1. Versuchstiere .....	16
3.2.2. Narkose .....	16
3.2.3. Chirurgische Technik .....	17
3.2.3.1. Makrohämodynamik .....	17
3.2.3.2. Reversible partielle Ischämie der Leber .....	17
3.2.3.3. Reperfusion .....	18
3.2.4. Kontrolltiere .....	18
3.2.5. Thrombozytenseparation .....	18
3.2.6. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....	19
3.2.6.1. Technischer Aufbau .....	19
3.2.6.2. Mikrozirkulatorische Parameter .....	20
3.2.6.3. Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion .....	20
3.2.6.4. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion .....	21
3.2.6.5. Sinusoidale Perfusion .....	22
3.2.6.6. Erythrozytenfließgeschwindigkeit .....	22
3.2.7. Thrombozytenzahl .....	22
3.2.8. Aktivitäten der Leberenzyme .....	23
3.2.9. Quantitative Analyse der Apoptose .....	23
3.2.9.1. Caspase-3-Assay .....	23
3.2.9.2. TUNEL-Färbung .....	24
3.2.9.3. Bisbenzamid-Färbung .....	24
3.3. VERSUCHSPROTOKOLLE .....	25
3.3.1. Systematische Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach I/R der Leber .....	25
3.3.1.1. Versuchsgruppen .....	25
3.3.1.2. Versuchsablauf .....	26
3.3.2. Bedeutung von P-Selektin für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach hepatischer I/R .....	27
3.3.2.1. Versuchsgruppen .....	28
3.3.2.2. Versuchsablauf .....	29
3.3.3. Einfluß von Thrombozyten auf den hepatozellulären I/R-Schaden .....	30
3.3.3.1. Experimentelle Gruppen und Versuchsablauf .....	30
3.3.3.2. Fibrinbindung am postischämischen Endothel .....	31

3.4. STATISTIK .....	32
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>33</b>
4.1. SYSTEMATISCHE ANALYSE DER THROMBOZYTEN-ENDOTHELZELL-INTERAKTION	33
4.1.1. Makrohämodynamik .....	33
4.1.2. Körperkerntemperatur .....	34
4.1.3. Mikrozirkulation .....	35
4.1.3.1. Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion .....	35
4.1.3.2. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion .....	41
4.1.3.3. Sinusoidale Perfusion .....	42
4.1.3.4. Erythrozytenfließgeschwindigkeit .....	45
4.1.4. Thrombozytenzahl .....	45
4.1.5. Leberenzyme .....	46
4.2 DIE BEDEUTUNG VON P-SELEKTIN FÜR DIE THROMBOZYTEN-ENDOTHELZELLEN- INTERAKTION NACH HEPATISCHER I/R .....	48
4.2.1. Makrohämodynamik .....	48
4.2.3. Mikrozirkulation .....	49
4.2.3.1. Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion .....	49
4.2.3.2. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion .....	52
4.2.3.3. Sinusoidale Perfusion .....	54
4.2.4. Leberenzyme .....	54
4.2.5. Hepatozelluläre Apoptose .....	55
4.3. EINFLUSS VON THROMBOZYTEN AUF DEN HEPATISCHEN I/R-SCHADEN .....	60
4.3.1. Mittlerer arterieller Blutdruck .....	60
4.3.2. Mikrozirkulation .....	60
4.3.3.1. Fibrinbindung am hepatischen Endothel .....	60
4.3.3.2. Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion .....	62
4.3.3.3. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion .....	65
4.3.3.4. Sinusoidale Perfusionsrate .....	66
4.3.4. Leberenzyme .....	67
4.3.5. Hepatozelluläre Apoptose .....	68
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>70</b>
5.1. MODELL .....	70
5.1.1. Versuchstiere .....	70
5.1.2. Chirurgische Präparation .....	71
5.1.3. Thrombozytenseparation .....	72
5.1.4. Experimentelles Protokoll .....	73
5.1.5. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....	74
5.1.6. Parameter des hepatozellulären Schadens .....	77
5.1.6.1. Leberenzyme .....	77
5.1.6.2. Apoptosemarker .....	77
5.2. DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....	79
5.2.1. Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber .....	79
5.2.1.1. "No-reflow" in der Leber .....	79
5.2.1.2. "Reflow"-Paradox in der Leber .....	80
5.2.2. Systematische Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in Abhängigkeit von Ischämie- und Reperfusionsdauer .....	83

5.2.3. Die Bedeutung von P-Selektin für die Thrombozyten-Endothelzell- Interaktion .....	86
5.2.4. Einfluß der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion auf den hepatischen I/R- Schaden.....	89
<b>6. SCHLUSSFOLGERUNG .....</b>	<b>94</b>
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>96</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>98</b>
<b>9. DANKSAGUNG .....</b>	<b>123</b>
<b>10. LEBENSLAUF .....</b>	<b>125</b>

## 1. EINLEITUNG

### ***1.1. Bedeutung von Ischämie-Reperfusion in der Leberchirurgie***

In der Chirurgie der Leber spielen Organschäden, welche durch Ischämie und anschließende Reperfusion (I/R) induziert werden, eine herausragende Rolle. Bedeutung hat dies insbesondere nach Lebertransplantation, Leberresektion, Lebertrauma sowie im Zustand nach hämorrhagischem Schock (Zentralisation)<sup>9</sup>. Bei Lebertransplantation wird die Organdurchblutung nach Abklemmen vom systemischen Kreislauf des Spenders komplett unterbrochen und, nach entsprechender Konservierung, erst nach Wiederanschluß an das Gefäßsystem wieder gewährleistet. Bei Betrachtung der absoluten Operationszahlen wird jedoch deutlich, daß Operationen in partieller Blutsperre der Leber eine wesentlich größere praktische Relevanz haben. Derzeit werden ca. 560 Lebertransplantationen pro Jahr in der BRD durchgeführt<sup>25</sup>. Weitaus mehr Eingriffe finden jedoch unter partieller reversibler Leberischämie statt. Die partielle Ischämie der Leber wird durch Abklemmen des *ligamentum hepatoduodenale* induziert und wurde bereits 1908 von Pringle beschrieben. Indikationen für dieses Verfahren stellen einerseits Operationen dar, bei denen Teile der Leber entfernt werden (z.B. Metastasen, Echinokokkuszysten usw.)<sup>70</sup>, andererseits kann auch bei ausgedehnten traumatischen Leberupturen die passagere Unterbrechung der Leberdurchblutung erforderlich sein, um eine effektive Reparatur des Schadens zu ermöglichen. In 12-29% der Fälle von stumpfen Lebertraumata kommt intraoperativ das Pringle-Manöver zur Anwendung, um primär nicht stillbare posttraumatische Leberblutungen kontrollieren zu können. Dabei ist zur Versorgung der Leberverletzung eine Ischämiezeit von 10-75 Minuten notwendig<sup>141</sup>. Eine funktionell wirksame Reduktion der Leberdurchblutung kann sich ergeben, wenn im Rahmen eines Volumenmangelschocks<sup>26, 61</sup> das Splanchnikusgebiet minderperfundiert

wird. Dies kann auch im kardiogenen Schock<sup>138</sup> bei funktionell wirksamem Vorwärts- oder Rückwärtsversagen eintreten wie auch im ausgeprägten septischen Schock<sup>117</sup>. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, daß dem I/R-Schaden entscheidende Bedeutung für die Induktion und Ausprägung postoperativer Organinsuffizienz bzw. Transplantantdysfunktion zukommt<sup>17, 98, 146</sup>.

## ***1.2. Ischämie-Reperfusionsschaden***

In jedem permanent perfundierten Gewebe fällt nach der Induktion einer Ischämie die Konzentration energiereicher Phosphate rasch ab. Die Ursache hierfür ist, daß der Organismus mittels aerober Glykolyse aus 1 mol Glukose 36 mol Adenosintriphosphat (ATP) bilden kann, welches dann als Energielieferant der gesamten Zelle zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu ermöglicht die anaerobe Glykolyse im ischämischen Gewebe lediglich die Bildung von 2 mol ATP aus 1 mol Glukose und führt darüber hinaus auch zu einer Anreicherung von Laktat, wodurch sich intrazellulär saure Valenzen ansammeln.

### ***1.2.1. "No-reflow"- Phänomen***

Der rasche Abfall der Konzentration von ATP führt zu einer Aktivitätsminderung der membranständigen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-ase, welche im Ruhezustand 70% des gesamten zellulären Energiehaushaltes verbraucht<sup>46</sup>. Damit wird weniger  $\text{Na}^+$  nach extrazellulär und weniger  $\text{K}^+$  nach intrazellulär transportiert. Der osmotische Gradient an der Zellmembran ist reduziert und freies  $\text{H}_2\text{O}$  strömt nach intrazellulär. Dies führt zu einem Anschwellen der ischämischen Zellen, was im kapillären Endstrombett eine Einengung der Kapillaren zur Folge hat. Dieses Phänomen wurde als "No-reflow" beschrieben, da selbst bei Wiedereinsetzen der Perfusion der kapilläre Widerstand im Endstrombett deutlich erhöht

ist und damit weniger Blut die Kapillaren erreicht<sup>46, 124</sup>. Darüberhinaus teilt sich die Kapillardurchblutung in Areale mit hohem zellulären Anteil, wie z.B. O<sub>2</sub>-transportierenden Erythrozyten, und niedrigem Fluß (*low-flow*), sowie in Gebiete mit hohem Fluß aber geringen zellulären Anteilen auf. Hierdurch wird der Transport von O<sub>2</sub> in das ohnehin schon hypoxische Gewebe weiter reduziert (schockspezifische Mikrozirkulationsstörung)<sup>126, 127</sup>.

### ***1.2.2. "Reflow"-Paradox***

Eine weitere Komponente des I/R-Schadens wurde als "*Reflow*"-Paradox beschrieben<sup>121, 11, 96, 109</sup>. Die intensiven Forschungen über den I/R-Schaden haben in den vergangenen Jahren Hinweise darauf ergeben, daß während der Reperfusion ein zusätzlicher Schaden zu dem bereits bestehenden Ischämieschaden induziert werden kann. Ursächlich werden hierfür mehrere intra- und extrazelluläre Pathomechanismen verantwortlich gemacht. So hat sich gezeigt, daß der während der Ischämie stattfindender Abbau von ATP über ADP zu AMP zu einer Ansammlung von Adenosin führt. Da für die Reutilisation des Adenosin mittels sauerstoffabhängiger Phosphorylierung das Substrat "Sauerstoff" fehlt, wird das überschüssige Adenosin in den Purinbasenabbau eingeschleust. Dabei reichert sich intrazellulär Hypoxanthin als Abbauprodukt von Adenosin an, welches unter sauerstoffarmen Bedingungen nicht weiter in Xanthin umgesetzt werden kann. Bei Reoxygenierung des Gewebes erfolgt dann ein rascher Umsatz des Hypoxanthins über die Xanthinoxidase zu Xanthin<sup>56, 153</sup>. Bei dieser Reaktion werden reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt. Diesen reaktiven Sauerstoffderivaten wird eine zentrale Bedeutung für die Ausbildung des Reperfusionsschadens zugeschrieben<sup>116</sup>. O<sub>2</sub>-Radikale aktivieren redoxsensitive Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF-κB oder AP-1<sup>116, 114, 115</sup> und



induzieren damit die Expression von proinflammatorischen Mediatoren (Zytokine, Chemokine) und Adhäsionsmolekülen<sup>19</sup>.

Ein für die initiale Interaktion von Leukozyten mit dem postischämischen Endothel bedeutsames Adhäsionsmolekül ist P-Selektin (CD62P). Es wird in den zytoplasmatischen Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen bzw. in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten gespeichert und nach Stimulation der Zellen, z.B. mit Histamin, Thrombin oder Sauerstoffradikalen, innerhalb von wenigen Minuten mobilisiert und auf der äußeren Plasmamembran exprimiert<sup>52</sup>. P-Selektin bindet wie alle Selektine mit niedriger Affinität an sialylierte und fukosylierte Glykane, bindet aber auch mit hoher Affinität an einige spezifische Glykoproteine, wie z.B. *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1). Die Interaktion zwischen P-Selektin und PSGL-1 scheint bei physiologischen Scherkräften Voraussetzung für das Rollen von Granulozyten am venolären Endothel zu sein<sup>137, 159</sup>.

Die gesteigerte Adhäsion von Leukozyten am postischämischen Endothel findet insbesondere im Bereich postkapillärer Venolen statt und trägt wesentlich zur Manifestation des durch I/R induzierten Gewebeschadens bei<sup>31, 63, 65, 66</sup>. So wurde beschrieben, daß die Anzahl adhärenter Leukozyten in den Venolen mit dem Ausmaß des Gewebeschadens korreliert<sup>62</sup>. Neben der Leukozyten-Adhäsion in den Venolen wurde auch das sog. Leukozyten-*Plugging* im kapillären Netzwerk in der Pathogenese des I/R-Schadens diskutiert<sup>63</sup>. Nach der mikrovaskulären Akkumulation von Leukozyten und deren Adhärenz am mikrovaskulären Endothel kommt es zur transendothelialen Emigration von Leukozyten in das perivaskuläre Gewebe und zur Triggerung leukozytärer Aktivierungsreaktionen<sup>65</sup>, wie z.B. der Ausschüttung zytotoxischer Degranulationsprodukte, welche die physiologische endotheliale Barrierefunktion zerstören. Damit können Flüssigkeit und Makromoleküle ins Interstitium eindringen,

wodurch sich der interstitielle Druck erhöht und die Versorgung mit nutritiven Substanzen bzw. die Entsorgung saurer Stoffwechselprodukte weiter verschlechtert werden<sup>59</sup>.

### ***1.2.3. Beteiligung von Thrombozyten am I/R-Schaden***

Es gibt zunehmend Hinweise darauf, daß auch Thrombozyten eine Rolle in der Pathogenese des postischämischen Reperfusionsschadens spielen. Bislang wurde eine Beteiligung von Thrombozyten am I/R-Schaden der Lunge<sup>140</sup>, des Pankreas<sup>91</sup>, des Herzens<sup>42</sup> und des Darmes<sup>110</sup> nachgewiesen. Die postischämische Reperfusion bewirkt eine Aktivierung und Akkumulation von Thrombozyten innerhalb des Gefäßbetts. Auffallend ist der Befund, daß Thrombozyten während der postischämischen Reperfusion des Dünndarms nicht nur am Endothel postkapillärer Venolen adhärieren, sondern - im Gegensatz zu Leukozyten – auch mit dem Endothel präkapillärer Arteriolen interagieren<sup>110-113</sup>.

Obwohl Thrombozyten keinen Zellkern besitzen, haben sie funktionelle Ähnlichkeiten mit Leukozyten. Sie haben einen Durchmesser von 2 bis 3 µm und weisen einen sehr komplexen Aufbau mit einem kanalikulären System auf, welches ihnen die Ausbildung von Pseudopodien ermöglicht und Beweglichkeit verleiht. Auf ihrer Zelloberfläche exprimieren sie zahlreiche Glykoproteine, welche die Adhäsion an die verletzte Gefäßwand vermitteln. Im Zellinneren finden sich Mitochondrien und Speichergranula (Abb.1). In diesen Glykogramula (dichte Granula, α-Granula) liegen u.a. von-Willebrand-Faktor (vWF) und P-Selektin in gespeicherter Form vor. Thrombozyten exprimieren eine Reihe von Adhäsionsmolekülen, die zur Zell-Zell-Interaktion beitragen, wie z.B. P-Selektin, PECAM-1 und mehrere Integrine, wie z.B. Glykoprotein IIb/IIIa und das Leuzinreiche Glykoprotein Ib<sup>143, 3, 13, 45</sup>.

**Tab.1:** Inhaltsstoffe der thrombozytären Speichergranula (nach Gawaz<sup>48</sup>)

<b>Dichte Granula</b>	<b><math>\alpha</math>-Granula</b>	<b>Lysosom</b>
ATP	<b>Enzyme</b>	$\alpha$ -Arabinoside
ADP	$\alpha_1$ -Antitrypsin	$\beta$ -Galactosidase
Serotonin	$\alpha_2$ -Makroglobulin	$\beta$ -Glucuronidase
Phosphat	$\alpha_2$ -Antiplasmin	N-Acetylglucosaminidase
Guaninnukleotide	C1-Esterase-Inhibitor	Elastase
	<b>adhäsive Proteine</b>	Kollagenase
	Fibrinogen	Kathepsin
	Fibronectin	
	von-Willebrand-Faktor	
	Thrombospondin	
	Vitronectin	
	Glykoprotein IIB/IIIa	
	<b>Wachstumsfaktoren</b>	
	Platelet-derived growth factor	
	Transforming growth factor $\beta$	
	Epidermal growth factor	
	Endothelial cell growth factor	
	<b>zytokinähnliche Proteine</b>	
	Interleukin 1 (?)	
	CD40-Ligand (?)	
	Plättchenfaktor 4	
	$\beta$ -Globulin	
	<b>Koagulationsfaktoren</b>	
	HMWK	
	Plasminogen	
	PAI-1	
	Faktor V	
	Faktor XI	
	Fibrinogen	
	Protein S	

Darüber hinaus setzen Thrombozyten Sauerstoffradikale<sup>43, 100, 103</sup> und proinflammatorische Mediatoren, wie Thromboxan A2, Leukotriene, Serotonin, Plättchenfaktor 4 und den *platelet-derived growth factor* frei<sup>54, 55, 102</sup>. Zusätzlich haben Plättchen die Fähigkeit, die Funktion von Leukozyten zu modulieren<sup>41, 154, 155</sup>. Insgesamt könnten daher die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten in der Mikrozirkulation den Endothelzellschaden verstärken und zur Leukozytenaktivierung bzw. -akkumulation beitragen.

Allerdings konnte die genaue Rolle der Thrombozyten in der Pathogenese des I/R-Schadens bisher nicht geklärt werden. In jüngsten Veröffentlichungen sind Mechanismen der postischämischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion erstmals beschrieben worden. Eine entscheidende Bedeutung für die initiale Interaktion von Thrombozyten mit dem postischämischen Endothel des Dünndarmes wurde für das Adhäsionsmolekül P-Selektin aufgezeigt<sup>111</sup>. Wie kürzlich *in vitro* aufgeklärt wurde, vermittelt PSGL-1 die Interaktion zwischen P-Selektin und Thrombozyten<sup>44</sup>. Ferner wird die Adhäsion von Leukozyten an immobilisierten Thrombozyten unter physiologischen Bedingungen durch P-Selektin mediiert<sup>92</sup>. P-Selektin vermittelt auch die Interaktion zirkulierender Leukozyten mit Thrombozyten und dem mikrovaskulären Endothel als Antwort auf oxidativ modifizierte Lipoproteine<sup>97</sup>.

Entsprechend dem Mehrschritt-Modell der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion<sup>15</sup> scheint auch die initiale Rolle von Thrombozyten die Voraussetzung für ihre permanente Interaktion mit der endothelialen Oberfläche zu sein. Wie kürzlich gezeigt wurde, wird diese Interaktion der Thrombozyten im postischämischen Darm über Fibrin(ogen) vermittelt, welches zwischen dem konstitutiv exprimierten *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) der Endothelzelle und dem entsprechenden GPIIb/IIIa-Liganden der Thrombozyten eine feste Bindung bewirkt<sup>112</sup>. Darüberhinaus ist bekannt,

daß bei Zerstörung der endothelialen Integrität vWF mit Gewebethromboplastin aus der subendothelialen Matrix reagiert und über den thrombozytären GPIb-Liganden eine permanente Adhäsion von Thrombozyten vermittelt. Der von vWF ist ein komplexes multimeres Glykoprotein, das eine zentrale Rolle für die Thrombozytenfunktion spielt. Außerdem dient im Blut zirkulierender vWF als Carrierprotein für den Gerinnungsfaktor VIII. Der vWF wird von Endothelzellen und Megakaryozyten gebildet, intrazellulär prozessiert und in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzelle und den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten gespeichert. Die Interaktion zwischen vWF und GPIb spielt *in vitro* eine wesentliche Rolle für die Thrombozytenadhäsion, insbesondere bei hohen Scherkräften, wie sie in Arteriolen und postkapillaren Venolen auftreten können<sup>4, 156, 157, 172</sup>.

Erste Hinweise für eine Beteiligung von Thrombozyten am hepatischen I/R-Schaden haben die Untersuchungen von *Cywes et al.* 1993 ergeben, welche sowohl mittels Elektronenmikroskopie an der isoliert-perfundierten Rattenleber als auch immunhistochemisch an der humanen Leber eine Adhäsion von Thrombozyten am hepatischen Endothel nach kalter (4°C) Ischämie zeigten<sup>27, 28</sup>. Weiterhin ließ sich am Modell der isoliert-perfundierten Rattenleber demonstrieren, daß nach I/R ca. 1/3 der im System befindlichen Thrombozyten in der Leber sequestriert werden und dabei endotheliale Apoptose induzieren können<sup>166</sup>. Über die Mechanismen der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der postischämischen Leber ist bislang jedoch nur wenig bekannt. *Yadav et al.*<sup>189</sup> zeigten mittels immunhistochemischer Methoden, daß die Thrombozytenaggregation in P-Selektin-defizienten Tieren reduziert ist. Desweiteren gibt es Hinweise darauf, daß auch Komplement<sup>165</sup> und aktivierte Kupfferzellen<sup>99, 167</sup> an der Induktion der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion beteiligt sein können.

Aufgrund dieser Erkenntnisse liegt der Schluß nahe, daß der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion große Bedeutung sowohl für die Induktion als auch für die Aufrechterhaltung des hepatischen I/R-Schadens zukommen könnte. Bislang liegt jedoch keine *in vivo* Untersuchung vor, welche die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion und die ihr zugrundeliegenden Mechanismen während hepatischer I/R analysiert hätte. Insbesondere ist nicht geklärt, inwiefern diese Interaktion einen Einfluß auf das Ausmaß des I/R-induzierten hepatozellulären Schadens der Leber nimmt.

## **2. ZIELSETZUNG**

Ziele der vorliegenden Studie waren daher

- 1) die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach hepatischer I/R mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie systematisch zu analysieren,
- 2) zu untersuchen, welche Mechanismen die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der Leber vermitteln und
- 3) zu analysieren, welchen Einfluß die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion auf den mikrovaskulären I/R-Schaden und die postischämische Apoptoseinduktion in der Leber ausübt.

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### ***3.1. Vorbemerkungen***

Die im folgenden vorgestellten Untersuchungen wurden in der Zeit von Oktober 1999 bis Januar 2001 mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (AZ 211-2531-66/98) am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt.

#### ***3.2. Modell***

##### ***3.2.1. Versuchstiere***

Als Versuchstiere dienten weibliche Wildtyp- (Charles River, Sultzfeld, Deutschland) und P-Selektin-defiziente (generiert und zur Verfügung gestellt von Prof. Beaudet, Houston, TX, USA<sup>14</sup>) C57BL/6-Mäuse mit einem Körpergewicht von 20 bis 25g. Die Mäuse wurden bei kontrolliertem Tag-/Nachtzyklus in Gruppen von 3 bis 5 Tieren in Makrolon-Käfigen gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und einem Standardfutter (Ssniff Spezialdiäten, Soest Deutschland).

##### ***3.2.2. Narkose***

Die Tiere wurden unter Spontanatmung mit einem Gemisch aus Isofluran (Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und N<sub>2</sub>O bei einer inspiratorischen Sauerstofffraktion von 0,35 narkotisiert. Die Narkose wurde durch Inhalation von 5 Vol.% Isofluran eingeleitet und während des gesamten Versuchsablaufs mit 1,0-2,0 Vol.% Isofluran aufrechterhalten.

Nach Einleitung der Narkose wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Heizplatte fixiert. Die Körpertemperatur wurde intraabdominell mit Hilfe einer Temperatursonde kontrolliert und zwischen 36°C und 37°C konstant gehalten.



### **3.2.3. Chirurgische Technik**

#### **3.2.3.1. Makrohämodynamik**

Zur Registrierung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) wurden bei allen Tieren die linke *A. carotis* und *V. jugularis* freigelegt und mit Polypropylenkatheter (Innendurchmesser 0,28 mm, Portex, Lythe, Großbritannien) kanüliert. Der MAP wurde mit Hilfe eines Druckaufnehmers (Statham Transducer Typ P 23 ID, Statham Instruments Inc., Oxnard, USA) und eines Elektromanometers (Press. Ampl. 863E154E, Siemens Medizinische Technik, München, Deutschland) in [mmHg] gemessen.

Die Implantation der Katheter in die *A. carotis* und *V. jugularis*, erfolgte an einem mikrochirurgischen Arbeitsplatz unter Verwendung eines Operationsmikroskopes (Leitz, Wetzlar, Deutschland), welches eine 5 bis 42-fache Vergrößerung ermöglicht.

Über den Katheter in der linken *V. jugularis* erfolgte die kontinuierliche Volumensubstitution mit Ringer-Laktat (RL; 0,2 ml/h; Perfusor V, B.Braun, München, Deutschland).

#### **3.2.3.2. Reversible partielle Ischämie der Leber**

Nach Platzierung der Katheter in die *A. carotis* und *V. jugularis* wurden die Tiere laparotomiert. Nach vorsichtigem Freipräparieren wurde mittels Gefäßclip die Blutversorgung des linken Leberlappens durch reversibles Abklemmen des zuführenden Gefäßnervenbündels unterbrochen<sup>7</sup>. Die Bauchhöhle wurde bei liegendem Clip mit 2 Nahtreihen geschlossen. Zur Kontrolle der Körperkerntemperatur der Tiere wurde eine Temperatursonde intraabdominell platziert.

### **3.2.3.3. Reperfusion**

Nach einer Ischämiezeit von 30, 60 oder 90 min wurde die Bauchhöhle wieder eröffnet und durch Entfernen des Mikroclips der hepatische Blutfluß wiederhergestellt. Der linke Leberlappen wurde dann zur intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie (IVM) ausgelagert und die postischämische Mikrozirkulation jeweils nach 30, 120 oder 240 min visualisiert und quantitativ analysiert. Eine speziell für die Maus entwickelte Auslagerungsvorrichtung ermöglichte eine kontinuierliche Superfusion des Organs mit unbegaster Ringer-Laktat-Lösung, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern.

### **3.2.4. Kontrolltiere**

Kontrolltiere (sham-operierte Tiere) wurden nach identischem Protokoll, d.h. Gefäßkanülierung und medianer Laparotomie, operiert und nach kurzfristigem Abklemmen des linken Leberlappens mittels Gefäßclip (etwa 3 Sek.) für die Intravitalmikroskopie vorbereitet. Die Beobachtungszeit betrug bei allen Kontrolltieren 30 Minuten.

### **3.2.5. Thrombozytenseparation**

Zur Visualisierung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion wurden Thrombozyten isoliert und *ex vivo* mit Rhodamin 6G markiert<sup>111</sup>. Für jedes Experiment wurde dazu Blut von einem syngenem Spendertier in Narkose (N<sub>2</sub>O-Isofluran) durch kardiale Punktion entnommen und in 1 ml-Polypropylen Röhrchen gesammelt. Je 1 ml Vollblut wurde in 0,2 ml Alsevers Puffer (38 mM Zitronen-Säure, 75 mM Trisodium citrat/100 mM Dextrose) und 0,5 ml PBS aufgenommen. Durch Zugabe von 50 µl 0,05% Rhodamin 6G (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) pro ml Vollblut wurden die Thrombozyten *in vitro*

fluorochromiert. Das Blut wurde dann 10 Minuten bei 250 x g zentrifugiert. Das dadurch demarkierte thrombozytenreiche Plasma wurde in 1 ml PBS aufgenommen und bei 2000 x g 10 Minuten zentrifugiert. Das resultierende Thrombozyten-Pellet wurde in 0,1 ml D-PBS (PAN Systems GmbH) re-suspendiert. Die Anzahl gewonnener Thrombozyten wurde in jeder Probe mit Hilfe eines Coulter-Counters (Coulter® AC-T-Serie; Coulter Corporation, Miami, USA) bestimmt. Dann wurde ein entsprechendes Volumen einer Suspension, welches ca.  $100 \times 10^6$  mit Rhodamin 6G-markierte Thrombozyten enthielt, i.a. appliziert. Bei Mäusen liegt die physiologische Thrombozytenzahl bei ca.  $600 \times 10^3 \mu\text{l}$  Vollblut. Das Blutvolumen beträgt ca. 5,85 ml/100g. Der Anteil markierter Thrombozyten an der Gesamtpopulation zirkulierender Thrombozyten lag damit bei ca. 10-20 %<sup>111</sup>.

### ***3.2.6. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie***

#### ***3.2.6.1. Technischer Aufbau***

Während der Reperfusionphase erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation. Der ausgelagerte linke Leberlappen wurde mit Hilfe eines Leitz-Orthoplan-Mikroskops (Leitz) mit einer Ploemo-Pak Lichtquelle (Leitz) und einer 100 Watt HBO Quecksilberlampe (OSRAM GmbH, München, Deutschland) untersucht. Alle intravitalmikroskopischen Analysen wurden in Epilluminationstechnik durchgeführt. Durch das Umschalten zwischen den Filterblöcken I<sub>2/3</sub> (Anregung 450-490 nm; Emission: 525 nm, Leitz) und N<sub>2</sub> (Anregung 530-560 nm; Emission: 580 nm, Leitz) wurde die Darstellung der mittels zweier unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe selektiv gefärbten mikrovaskulären Gefäßen und Blutzellen erreicht.

Mit Hilfe eines 25x Wasserimmersionsobjektives (W 25x/0,6; Leitz) wurde eine 500-fache Vergrößerung erzielt. Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden mittels einer

*charge-coupled device* (CCD)-Videokamera (FK 6990, Cohu, Prospective Measurements, San Diego, USA) auf einem Bildschirm (Diagonale: 33 cm; Sony, München, Deutschland) wiedergegeben und für die spätere Auswertung mittels einer Videoanlage (S-VHS Panasonic AG 7330, Matsushita Electric, Tokyo, Japan) aufgezeichnet.

Nach Visualisierung der Thrombozyten wurde zusätzlich Rhodamin-6G (0,1 ml 0,2%,  $M_r$  479, Sigma-Aldrich) appliziert, um auch die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion darstellen zu können. Zur Kontrastierung der hepatischen Mikrozirkulation wurde als Plasmamarker 0,1 ml 5% Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-markiertes Dextran ( $M_r$  150000; Sigma-Aldrich) verwendet. Erythrozyten stellen sich dabei im Negativkontrast schwarz dar. Die Farbstoffe wurden intravenös in beschriebener Reihenfolge injiziert. Die gesamte Untersuchungszeit betrug 25 Minuten. Danach erfolgten die Entnahme von Blut- und Gewebeproben und die Tötung der Tiere durch eine Überdosis von Pentobarbital.

#### ***3.2.6.2. Mikrozirkulatorische Parameter***

In einem ersten Arbeitsgang erfolgte die Untersuchung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion, dann der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und letztlich der sinusoidalen Perfusionsrate und der Erythrozytenfließgeschwindigkeit in hepatischen Mikrogefäßen. Durch Variation der Fokusebene wurden oberflächliche präsinusoidale Arteriolen, Sinusoide und postsinusoidale Venolen in der Leber sichtbar gemacht.

#### ***3.2.6.3. Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion***

Die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion wurde in 5-7 präsinusoidalen Arteriolen (mittlerer Durchmesser 20  $\mu\text{m}$ ), 5-7 postsinusoidalen Venolen (mittlerer Durchmesser 30  $\mu\text{m}$ ) und 5-7 Azini pro Tier nach der Applikation von Rhodamin-6G markierten

Thrombozyten untersucht. Von jedem Gefäß wurden unter Verwendung des N<sub>2</sub>-Filterblocks Videosequenzen von 20 Sekunden Länge aufgezeichnet. Die quantitative Beurteilung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion erfolgte *off-line* mit Hilfe des *Computer Assisted Microcirculation Analysis System, CAMAS<sup>®</sup>* (Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland)<sup>194</sup>. Über ein jeweils definiertes Gefäßsegment von 100 µm wurden die Thrombozyten, je nach ihrer Interaktion mit dem mikrovaskulären Endothel, als nicht adhärente Zellen, als rollende oder als fest adhärente Zellen klassifiziert. Als Roller wurden dabei diejenigen Thrombozyten definiert, welche Aufgrund von Margination und Endothelkontakt eine gegenüber dem Zentralstrom deutlich reduzierte Fließgeschwindigkeit aufwiesen. Die Ergebnisse sind in der Dimension Anzahl der Zellen pro Sekunde pro Millimeter Durchmesser der Gefäße angegeben. Als adhärente Zellen wurden diejenigen Thrombozyten bezeichnet, die länger als 20 Sekunden ohne Positionsänderung am dem Endothel anhafteten; sie sind als Zahl der Zellen pro Quadratmillimeter Endotheloberfläche angegeben. Die Endotheloberfläche wurde aus Gefäßdurchmesser und Länge des untersuchten Segments errechnet, wobei eine zylindrische Geometrie des entsprechenden Gefäßabschnittes angenommen wurde<sup>7</sup>. In Sinusoiden wurde die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion als Anzahl stagnierender Thrombozyten pro Azinus bzw. azinäres Segment quantifiziert. Alle Daten wurden unmittelbar nach der quantitativen Auswertung in die Eingabemasken einer programmierten Datenbank (Excel, Microsoft, Washington, USA) eingegeben, welche die weiteren Berechnungen einschließlich der formatierten Übergabe an die Statistik-Software ermöglichte.

#### **3.2.6.4. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion**

Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurde in 5-7 postsinusoidalen Venolen visualisiert. Mit Hilfe des CAMAS wurde eine quantitative Analyse durchgeführt. Rollende und adhärente Leukozyten wurden nach den obengenannten Kriterien (siehe 3.2.6.3.) definiert und gezählt.

#### **3.2.6.5. Sinusoidale Perfusion**

Zur Bestimmung der sinusoidalen Perfusion wurde nach der Applikation von FITC-Dextran zur Plasmakontrastierung die Anzahl der nicht-perfundierten Sinusoide in 5-7 Azini gezählt und als prozentualer Anteil [%] aller sichtbaren Sinusoide innerhalb eines Azinus angegeben<sup>86</sup>. Die sinusoidale Perfusion wurde periportal, midzonal und perizentral entsprechend der zonalen Gliederung des Azinus analysiert<sup>7</sup>.

#### **3.2.6.6. Erythrozytenfließgeschwindigkeit**

Die Fließgeschwindigkeit von Erythrozyten in Sinusoiden, präsinusoidalen Arteriolen und postsinusoidalen Venolen wurde in [mm/s] bestimmt (7-10 Einzelmessungen). Dabei wurde mit Hilfe des CAMAS die von einer roten Blutzelle zurückgelegte Wegstrecke  $\Delta s$  bestimmt und über  $v = \Delta s / \Delta t$  die entsprechende Geschwindigkeit in [mm/s] berechnet.

#### **3.2.7. Thrombozytenzahl**

Um zu überprüfen, ob I/R die Anzahl zirkulierender Thrombozyten beeinflusst, wurde gleich nach der Platzierung der Katheter in *A. carotis* und *V. jugularis* und am Ende des Versuchs bei allen Tieren die Zahl der Thrombozyten [in  $n \times 10^3 \mu\text{l}$ ] und der Hämatokrit [%] im Vollblut mit Hilfe eines Coulter-Counters (Coulter® AC-T-Serie; Coulter

Corporation) bestimmt. Um Verzerrungen aufgrund von Hämodilution zu reduzieren, wurden alle Werte auf einen Hämatokrit von 45% standardisiert. Die Thrombozytenanzahl nach I/R wurde als Anteil [%] der präoperativen Werte angegeben.

### **3.2.8. Aktivitäten der Leberenzyme**

Als Maß des hepatozellulären Zellschadens diente die Serumaktivität der spezifischen Leberenzyme Aspartat-Aminotransferase (AST/GOT) und Alanin-Aminotransferase (ALT/GPT). Die Probengewinnung erfolgte am Ende des Versuchs: Es wurde circa 1 ml arterielles Blut gewonnen und in EDTA-beschichtete Probengefäße gesammelt. Die Blutproben wurden anschließend bei 36<sup>0</sup> C und bei 2000x g 10 min zentrifugiert (Routina 35R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland), das Plasma abpipettiert und bis zum Zeitpunkt der Bestimmung bei -80<sup>0</sup> C eingefroren. Die Enzymaktivitäten wurden spektrophotometrisch (Hitachi 917, Roche-Boehringer, Mannheim, Deutschland) entsprechend den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie in [IU/L] bestimmt. Zur Standardisierung wurden die Ergebnisse der Enzymaktivität auf ein Gesamteiweiß von 4,92 [g/dl] normiert.

### **3.2.9. Quantitative Analyse der Apoptose**

Die Untersuchung hepatischer Apoptose erfolgte einerseits durch die funktionelle Bestimmung der Aktivität des spezifischen Apoptose-Induktors Caspase-3 im Lebergewebe, und andererseits morphologisch mittels TUNEL-Färbung bzw. durch die intravitalmikroskopische Visualisierung fragmentierter DNA und Kernkondensation nach Applikation von Bisbenzamid<sup>184</sup>.

### **3.2.9.1. Caspase-3-Assay**

Kryoproben des Lebergewebes wurden in 1 ml des Lysepuffers (HEPES 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM; pH 7,5) homogenisiert. Nach der Zentrifugation (4°C, 5 min, 10000x g) zur Entfernung von Zelltrümmern wurde die Eiweißkonzentration mittels der BRADFORD-Methode unter Verwendung einer Ovalbumin-Standardlösung bestimmt. Die Aktivität der Caspase-3 wurde über die Umsetzung des spezifischen Substrates Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (Alexis Co., Läufelfingen, Schweiz) untersucht. Eine Standardkurve wurde durch die serielle Verdünnung von Cumarin generiert. Die Aktivität der Caspase-3 wurde photometrisch (Anregung: 390 nm; Emission: 460 nm; FLUOstar<sup>®</sup>, Offenburg, Deutschland) bestimmt. Die Ergebnisse sind als Aktivität in [nmol/h/mg Protein] dargestellt.

### **3.2.9.2. TUNEL-Färbung**

Lebergewebe wurde in 4% Paraformaldehyd (pH 7,4) fixiert, in Paraffin eingebettet und mittels eines Mikrotoms geschnitten. Die Schnitte (6 µm) wurden mittels TUNEL-Methode (*in situ cell death detection kit*, Boeringer Mannheim Co., Germany), wie von *Grasl-Kraupp et al*<sup>57</sup> beschrieben, angefärbt. TUNEL-positive Zellen wurden mittels Lichtmikroskopie (Vergrößerung x400) in 10 Gesichtsfeldern ausgezählt<sup>166</sup>.

### **3.2.9.3. Bisbenzamid-Färbung**

In einer separaten Versuchsserie wurden die Fragmentation der DNA und die Kernkondensation als Marker der hepatozellulären Apoptose mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Nach 90 min isolierter reversibler Ischämie des linken Leberlappens und 60 min Reperfusion wurden Zellkerne des Lebergewebes mittels



i.a. Applikation von Bisbenzamid H33342 (20 mM/kg KG, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefärbt. Die intravitalmikroskopische Epiillumination erfolgte durch die Verwendung eines UV-Filterblockes (Anregung 340-380 nm, Emission 450 nm, Leitz).

### ***3.3. Versuchsprotokolle***

Entsprechend den unter Punkt 2 genannten Zielen wurden in der vorliegenden Arbeit drei unterschiedliche Versuchsprotokolle verwendet,

- 1) zur systematischen Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach I/R der Leber;
- 2) zur Untersuchung der Rolle von P-Selektin für diese Interaktion;
- 3) zur Analyse des Einflusses von Thrombozyten auf den I/R-Schaden der Leber.

#### ***3.3.1. Systematische Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach I/R der Leber***

##### ***3.3.1.1. Versuchsgruppen***

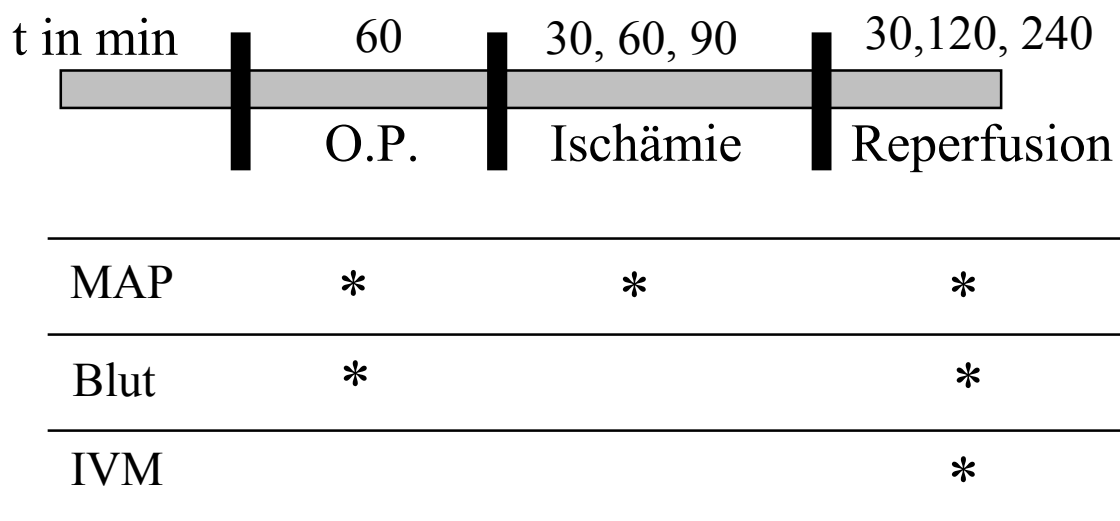
Zur systematischen Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in Abhängigkeit von der Ischämie- bzw. Reperusionszeit wurden insgesamt 10 Versuchsgruppen untersucht (Tab. 2.). Da in Vorversuchen mit n=3 gezeigt werden konnte, daß die Reperusionszeit im Zeitintervall zwischen 30 und 240 min nur einen geringeren Einfluß auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion hat, wurde darauf verzichtet, alle Gruppen in einer Stärke von n=7 zu analysieren. Um statistische Untersuchungen zu ermöglichen, wurden Experimente in den Gruppen 1,2 und 8 mit n=7 Tieren durchgeführt (Tab.2).

**Tab.2.** *Versuchsgruppen zur systematischen Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach hepatischer I/R*

<b>Gruppe Nr.</b>	<b>Ischämiedauer [min]</b>	<b>Reperfusionsdauer [min]</b>	<b>Tiere [n]</b>
1	sham	30	7
2	30	30	7
3	30	120	3
4	30	240	3
5	60	30	3
6	60	120	3
7	60	240	3
8	90	30	7
9	90	120	3
10	90	240	3

### **3.3.1.2. *Versuchsablauf***

Eine Synopsis des experimentellen Protokolls ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Der Versuch begann mit einer 60-min Operation gefolgt von jeweils 30, 60 oder 90 min Ischämie je nach Versuchsgruppe (siehe oben). Im Anschluß daran wurde der Mikroclip entfernt und die Leber reperfundiert. Untersuchungen der hepatischen Mikrozirkulation erfolgten nach jeweils 30, 120 oder 240 min Reperfusion. Im Anschluß an die IVM wurden die Tiere getötet und Blut bzw. Organproben entnommen.



**Abb. 1.** Experimentelles Protokoll zur systematischen Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach hepatischer I/R

### 3.3.2. Bedeutung von P-Selektin für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach hepatischer I/R

Die Mechanismen der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach hepatischer I/R sind nur unzureichend aufgeklärt (vgl. Einleitung). Während in anderen Organen, wie z.B. dem Herzen, den Lungen und dem Darm, eine substantielle Rolle der Adhäsionsmoleküle P-Selektin für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach I/R demonstriert wurde, liegen in der Leber bislang nur *ex vivo* Untersuchungen vor, die eine reduzierte Thrombozytenaggregation in P-Selektin-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nach I/R mittels Immunhistochemie zeigen konnten. *In vivo* ist über die Rolle von P-Selektin im Rahmen der postischämischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der Leber nichts bekannt.

Ziel des zweiten Abschnitts der Arbeit war es daher, die Bedeutung von P-Selektin für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion und für den mikrovaskulären und hepatozellulären Organschaden nach I/R der Leber zu untersuchen.

### **3.3.2.1. Versuchsgruppen**

Die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion wurde an Wildtyp-Mäusen in einer Kontrollgruppe und in einer Gruppe nach 90 min Ischämie und 20 min Reperfusion untersucht (n=7). Als Thrombozytenspender dienten in diesen beiden Gruppen P-Selektin-positive Tiere. In einer dritten Gruppe, wurden P-Selektin-defiziente Thrombozyten den P-Selektin-defizienten Tieren nach I/R infundiert (n=7).

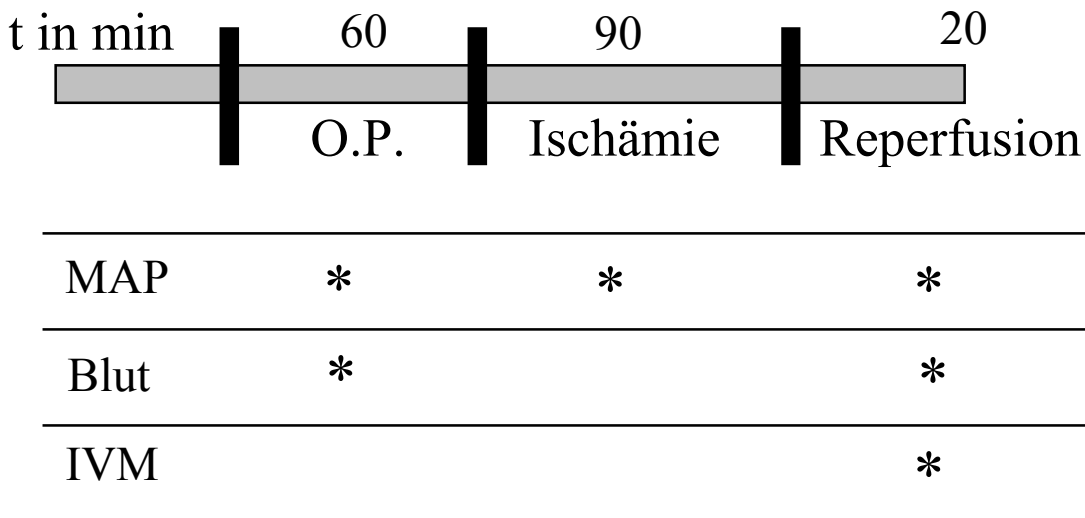
Um die Rolle des endothelialen im Vergleich zum thrombozytären P-Selektin für die postischämische Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion zu klären, wurden P-Selektin-defiziente Thrombozyten den Wildtyp-Tieren (n=7) appliziert bzw. Wildtyp-Thrombozyten den P-Selektin-defizienten Tieren (n=7) nach I/R infundiert (Tab. 3).

**Tab. 3.** *Versuchsgruppen zur Untersuchung der Rolle von P-Selektin für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach hepatischer I/R*

<b>Gruppe</b>	<b>Tiere [n]</b>
Kontrolle CD62P+/+	7
I/R CD62P+/+	7
I/R CD62P -/- Endothel und CD62P-/-applizierte Thrombozyten	7
I/R CD62 -/- applizierte Thrombozyten	7
I/R CD62 -/-Endothel	7

### 3.3.2.2. Versuchsablauf

In Inhalationsanästhesie wurde in Wildtyp- und CD62P<sup>-/-</sup>-C57BL/6-Mäusen eine reversible Ischämie des linken Leberlappens für 90 min induziert (Abb 2). Als Kontrolle wurden schein-operierte Wildtyp-Tiere untersucht. Thrombozyten wurden aus separaten syngeneten (CD62P<sup>+/+</sup> bzw. CD62P<sup>-/-</sup>) Spendertieren isoliert, mittels Rhodamin-6G *ex vivo* angefärbt und intraarteriell nach 20 Minuten Reperfusion appliziert. Die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und die sinusoidale Perfusionsrate wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren mittels IVM visualisiert und quantitativ analysiert. Am Versuchsende wurden Gewebeproben und Blutproben entnommen. Danach wurden die Tiere mit einer Überdosis von Pentobarbital getötet.



**Abb. 2.** Experimentelles Protokoll der Untersuchungen zum Einfluß der P-Selektin-Expression auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion und die Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens

### **3.3.3. Einfluß von Thrombozyten auf den hepatozellulären I/R-Schaden**

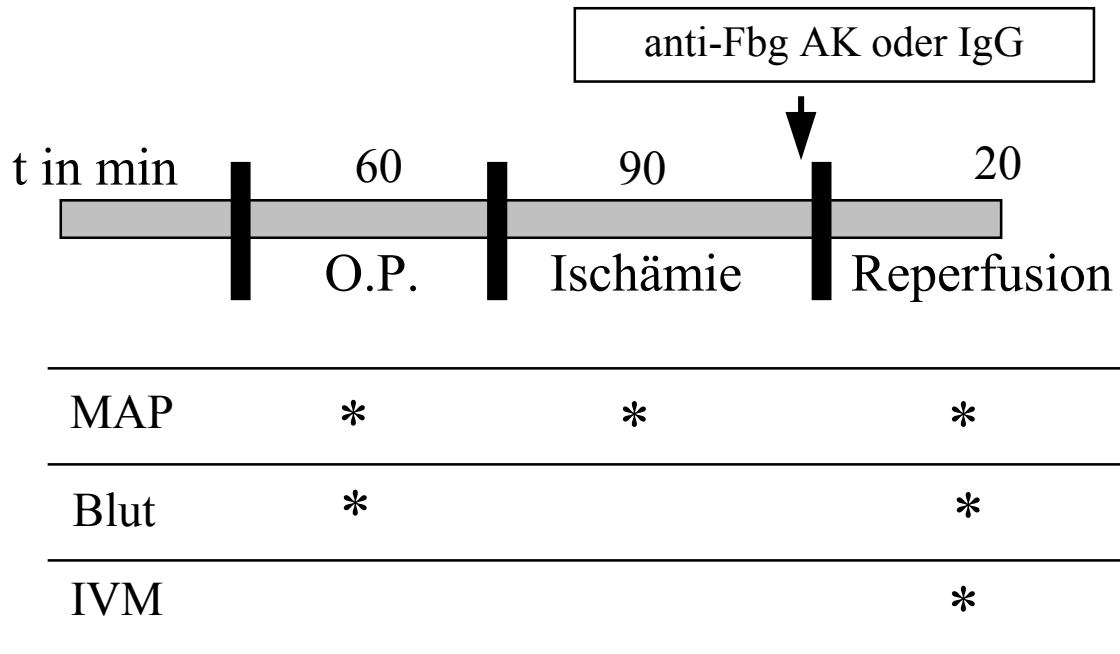
Da aus der Literatur bekannt ist, daß die Blockade von P-Selektin auch die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in postischämischen Venolen reduzieren kann, sollten diese Untersuchungen die differentielle Bedeutung der Thrombozyten im Vergleich zu Leukozyten näher aufklären. Wie Untersuchungen am postischämischen Darm gezeigt haben<sup>112</sup>, wird die postischämische Thrombozytenadhäsion über Fibrinogen vermittelt, welches zwischen dem konstitutiv exprimierten ICAM-1 der Endothelzelle und dem entsprechenden GPIIb/IIIa-Liganden der Thrombozyten eine feste Bindung herstellt.

Wir stellten die Hypothese auf, daß Fibrinogen nach Ischämie-Reperfusion der Leber die Thrombozytenadhäsion vermittelt. Darüberhinaus sollte eine Hemmung dieses Mechanismus die Untersuchung der differentiellen Bedeutung der Thrombozyten gegenüber der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bei der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens demonstrieren.

#### **3.3.3.1. Experimentelle Gruppen und Versuchsablauf**

Wie eingangs beschrieben, wurden die Tiere laparotomiert und der linke Leberlappen für 90 min reversibel abgeklemmt. Die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion wurde in einer Kontrollgruppe (n=7) und in einer Gruppe nach Ischämie-Reperfusion untersucht (n=7). In einer dritten I/R-Gruppe wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Maus-Fibrinogen (4 mg/kg KG; Nordic Immunology, Tilburg, Niederlande) kurz vor Beginn der Reperfusion intravenös appliziert (n=7)<sup>112</sup>. In einer weiteren Gruppe wurde ein Kontroll-IgG (4 mg/kg KG) i.v. infundiert (n=4), um auszuschließen, daß die durch den Fibrinogen-Antikörper vermittelten Effekte lediglich unspezifische Artefakte sind. Nach 20 min Reperfusion erfolgten die Applikation von *ex vivo* mit Rhodamin 6G markierten Thrombozyten und intravitalmikroskopische Untersuchungen nach dem eingangs

beschriebenen Protokoll (Abb. 3). Wiederum wurden Gewebe- und Blutproben entnommen.



**Abb. 3.** Experimentelles Protokoll zur Untersuchung des Einflusses der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion auf den I/R Schaden der Leber.

### 3.3.3.2. Fibrinbindung am postischämischen Endothel

Die Fibrin(ogen)ablagerung am hepatischen Endothel wurde *in vivo* in präsinusoidalen Arteriolen, postsinusoidalen Venolen und Sinusoiden mittels IVM visualisiert. Alexa 488-konjugiertes Fibrinogen (17 mg/kg KG, Molecular Probes, Eugene, USA), wurde kurz vom Ischämiebeginn intravenös injiziert<sup>112</sup>. Die Fibrinogenbindung auf dem postischämischen Endothel wurde unter Kontrollbedingungen (n=3) und nach 90 min Ischämie/30 min Reperfusion (n=3) in 5-7 präsinusoidalen Arteriolen, 5-7 Sinusoiden und 5-7 postsinusoidalen Venolen untersucht.

### ***3.4. Statistik***

Die Ergebnisse sind als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Sämtliche statistischen Analysen wurden unter Verwendung des Software Pakets Sigma Stat <sup>TM</sup> (Jandel Corporation, St. Rafael, CA, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt von dem Student-Newman-Keuls-Test auf statistische Unterschiede überprüft. Unterschiede wurden bei  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.



## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Systematische Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse der systematischen Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach hepatischer Ischämie-Reperfusion in Abhängigkeit von der Ischämie- und Reperfusionszeit dargestellt werden.

#### 4.1.1. Makrohämodynamik

Kontrollgruppe: Bei den schein-operierten Kontrolltieren waren über den gesamten Verlauf des Experiments keine signifikanten Änderungen des mittleren arteriellen Blutdrucks zu ermitteln. Der MAP lag dabei zu Versuchsbeginn bei  $94 \pm 3$  [mmHg], am Versuchsende bei  $94 \pm 2$  [mmHg].

I/R-Gruppen: In allen I/R-Gruppen blieb der MAP über den gesamten Beobachtungsraum stabil ohne Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. (Tab.4-6).

**Tab.4.** MAP-Ausgangswerte in [mmHg]

Ischämie [min]	Reperfusion [min]		
	30	120	240
30	$97 \pm 3$	$90 \pm 5$	$90 \pm 5$
60	$93 \pm 9$	$90 \pm 5$	$92 \pm 3$
90	$99 \pm 2$	$91 \pm 3$	$90 \pm 6$

**Tab. 5.** MAP während der Ischämie in [mmHg]

<b>Ischämie [min]</b>	<b>Reperfusion [min]</b>		
	30	120	240
30	97±3	99±4	91±5
60	94±8	90±5	93±2
90	99±1	91±3	92±5

**Tab. 6.** MAP während der Reperfusionszeit in [mmHg]

<b>Ischämie [min]</b>	<b>Reperfusion [min]</b>		
	30	120	240
30	95±3	89±4	91±2
60	91±4	91±3	91±3
90	98±2	90±3	90±4

#### **4.1.2. Körperkerntemperatur**

Die Körpertemperatur wurde in allen Versuchsgruppen kontinuierlich kontrolliert und lag immer zwischen 36°C-37°C (Tab. 7).

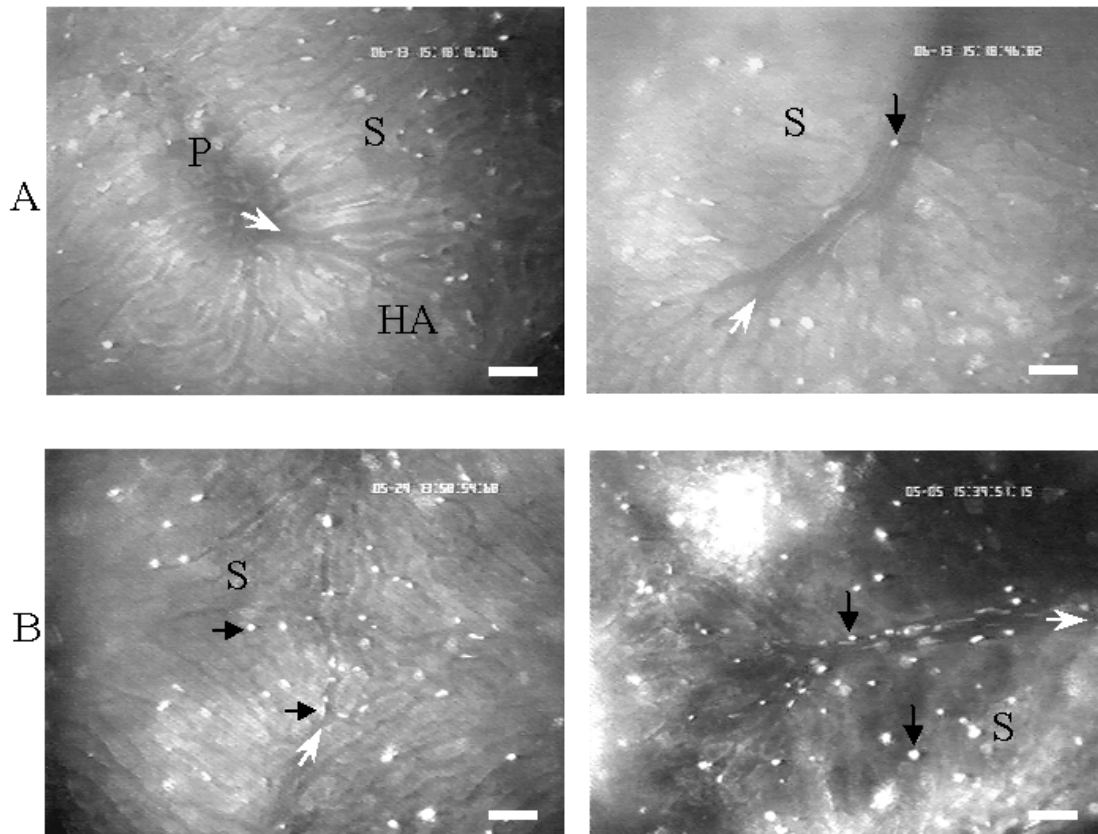
**Tab. 7.** Körperkerntemperatur während Ischämie in [°C]

<b>Ischämie [min]</b>	<b>Reperfusion [min]</b>		
	30	120	240
30	36,3±0,2	36,6±0,2	36,6±0,3
60	36,8±0,2	36,5±0,1	36,9±0,1
90	36,4±0,2	36,0±0,7	37,0±0,1

#### **4.1.3. Mikrozirkulation**

##### **4.1.3.1. Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion**

Die mit Rhodamin-6G-markierten Thrombozyten waren in präsinusoidalen Arteriolen, Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen gut visualisierbar. Permanent adhärente Thrombozyten fanden sich nicht nur in postsinusoidalen Venolen und Sinusoiden, sondern auch in Arteriolen (Abb. 4).



**Abb. 4.** Intravitalmikroskopische Aufnahmen der hepatischen Mikrozirkulation nach Applikation von Rhodamin-gefärbten Thrombozyten mit postischämischer Thrombozyten-Akkumulation in präsinusoidalen Arteriolen (links) und postsinusoidalen Venolen (rechts) nach 90-minütiger Ischämie und 30 Minuten Reperfusion. Während unter Kontrollbedingungen (A) nur wenige Thrombozyten mit dem hepatischen Endothel interagierten, fanden sich nach I/R deutlich mehr Thrombozyten sowohl in Arteriolen als auch Venolen und Sinusoiden (B). Die weißen Pfeile geben die Flußrichtung des Blutes an, die schwarzen Pfeile weisen auf am Endothel adhärenente Thrombozyten. S: Sinusoide; HA: Arteriole; P: Portale Gefäße. Vergrößerung x500. Balkenlänge 50 µm.

Bei den Kontrolltieren interagierten nur wenige Thrombozyten mit dem Endothel in präsinusoidalen Arteriolen, postsinusoidalen Venolen und Sinusoiden. In Arteriolen bzw. Venolen wurden  $0,4 \pm 0,1$  [1/s/mm] bzw.  $0,8 \pm 0,1$  [1/s/mm] rollende und  $63,6 \pm 4,8$  [1/mm<sup>2</sup>] bzw.  $66,0 \pm 4,6$  [1/mm<sup>2</sup>] permanent adhärenente Thrombozyten beobachtet. In Sinusoiden wurden unter Kontrollbedingungen kein Thrombozytenrollen und nur geringe

Thrombozytenadhärenz (periportal:  $0,6 \pm 0,1$  [1/Segment], midzonal:  $0,9 \pm 0,1$  [1/Segment] und perizentral:  $0,6 \pm 0,1$  [1/Segment] registriert.

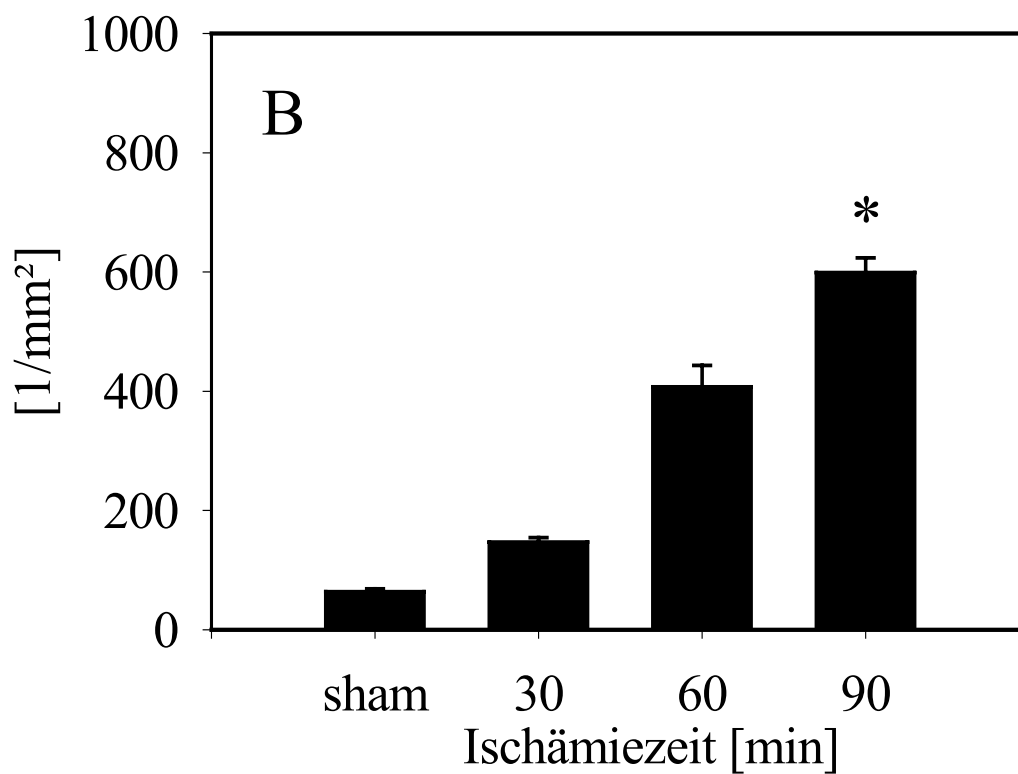
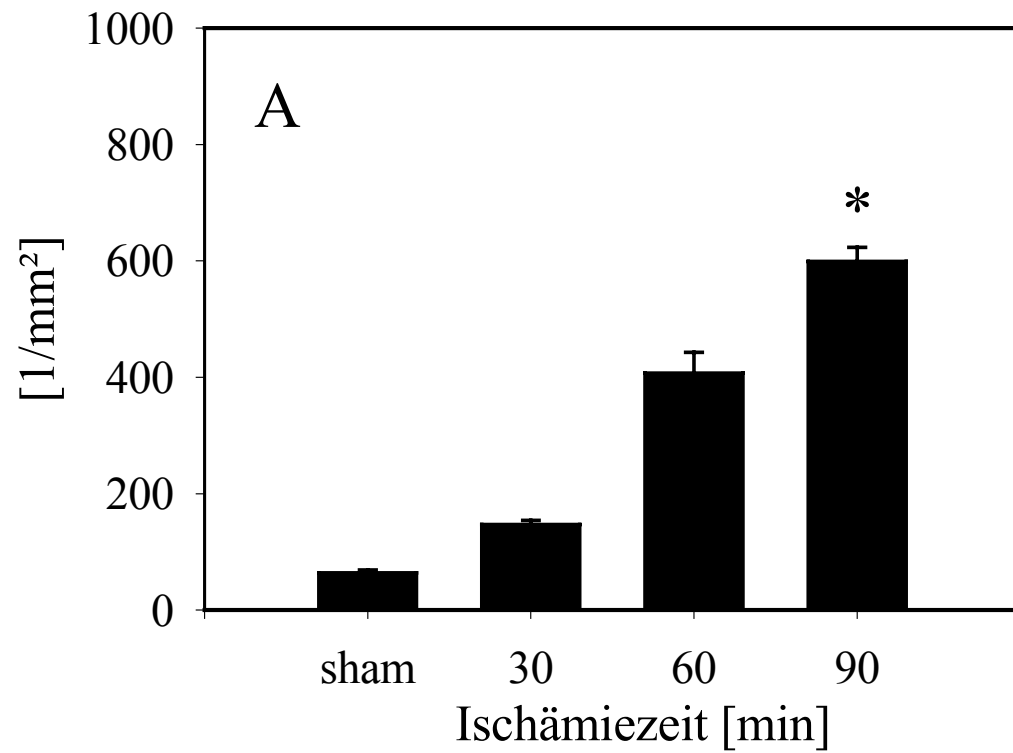
In den I/R-Gruppen wurde die Abhängigkeit der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion von der Ischämiedauer untersucht. Hierbei fand sich nach 30 min Ischämie gefolgt von 30 min Reperfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe ein geringer Anstieg der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in Arteriolen, Sinusoiden und Venolen. Dabei wurden in Arteriolen  $1,4 \pm 0,3$  [1/s/mm] rollende und  $146,8 \pm 7,2$  [1/mm<sup>2</sup>] adhärenente Thrombozyten und in Venolen  $2,4 \pm 0,2$  [1/s/mm] rollende und  $182,2 \pm 13,7$  [1/mm<sup>2</sup>] adhärenente Thrombozyten registriert. In den Sinusoiden betrug die Anzahl adhärenenter Thrombozyten  $1,9 \pm 0,2$  [1/Segment] periportal,  $2,6 \pm 0,2$  [1/Segment] midzonal und  $1,8 \pm 0,2$  [1/Segment] perizentral.

Nach 60 min Ischämie wurde demgegenüber bei gleichbleibender Reperfluationszeit eine tendenziell vermehrte Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion beobachtet. Die Anzahl rollender Thrombozyten lag in Arteriolen bei  $4,3 \pm 0,5$  [1/s/mm] und in Venolen bei  $5,3 \pm 0,1$  [1/s/mm]. Die Anzahl fest adhärenenter Thrombozyten war in Arteriolen  $377,1 \pm 35,9$  [1/mm<sup>2</sup>] und in Venolen  $407,9 \pm 21,6$  [1/mm<sup>2</sup>]. Ohne wesentliche Unterschiede war die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in den Sinusoiden: periportal:  $2,2 \pm 0,1$  [1/Segment], midzonal:  $3,4 \pm 0,2$  [1/Segment], perizentral:  $2,1 \pm 0,1$  [1/Segment].

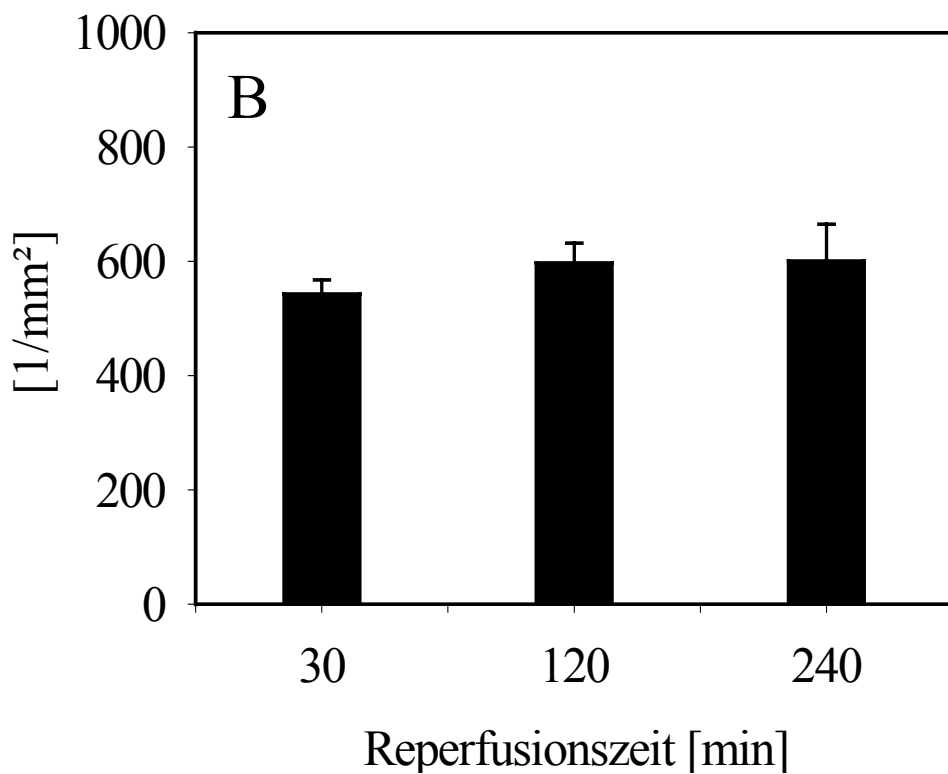
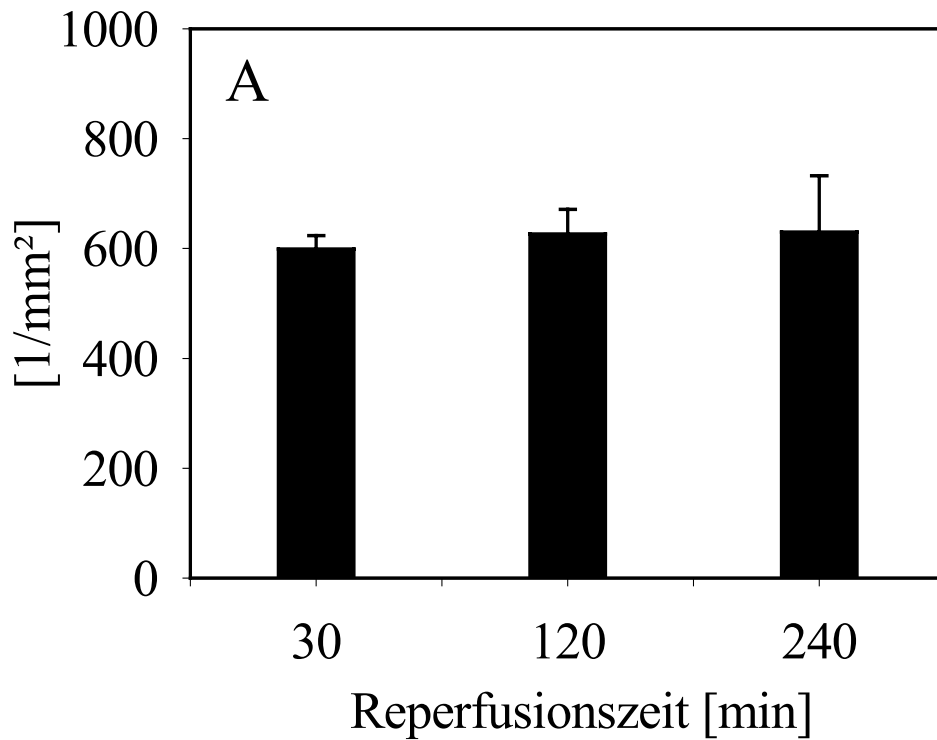
Nach 90 min Ischämie und 30 min Reperfusion wurde in den hepatischen Mikrogefäßen ein signifikanter Anstieg der Anzahl rollender und adhärenenter Thrombozyten beobachtet (Abb. 5). Dabei fanden sich sowohl in Arteriolen ( $6,0 \pm 0,5$  [1/s/mm]) als auch in Venolen ( $6,5 \pm 0,2$  [1/s/mm]) eine signifikant erhöhte Anzahl rollender Thrombozyten. Damit einhergehend war die Anzahl permanent adhärenenter Thrombozyten signifikant sowohl in Arteriolen  $599,0 \pm 24,6$  [1/mm<sup>2</sup>] als auch in Venolen  $542,8 \pm 24,3$  [1/mm<sup>2</sup>] erhöht.

In den Sinusoiden war die Anzahl permanent adhärenter Thrombozyten signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (pp:  $3,3 \pm 0,2$  [1/Segment], mz:  $4,7 \pm 0,3$  [1/Segment], pz:  $3,6 \pm 0,3$  [1/Segment]), während die Anzahl der rollenden Thrombozyten unverändert war.

Die unterschiedliche Reperfusionzeit hatte im Gegensatz zur Ischämiedauer keinen Einfluß auf die Anzahl rollender und permanent adhärenter Thrombozyten (Abb. 6). Aufgrund der Ergebnisse dieser systematischen Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach hepatischer I/R wurden die nachfolgenden Untersuchungen zu den Mechanismen dieser Interaktion nach 90 min Ischämie und 30 min Reperfusion durchgeführt.



**Abb. 5.** Anzahl permanent adhärenter Thrombozyten in hepatischen Arteriolen (A) und Venolen (B) in Abhängigkeit von der Ischämiezeit. Reperfusion 30 min.  $MW \pm SEM$ , \*  $p < 0,05$  vs. Sham,  $n=7$  bei I 30 min und I 90 min,  $n=3$  bei I 60.



**Abb. 6.** Anzahl permanent adhärenter Thrombozyten in Arteriolen (A) und Venolen (B) in Abhängigkeit von der Reperusionszeit. Ischämie 90 min.  $MW \pm SEM$ , \*  $p < 0,05$  vs. Sham,  $n=7$  bei R 30 min,  $n=3$  bei R 120 min und R 240 min.



#### **4.1.3.2. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion**

Leukozyten wurden mittels intravenöser Applikation von Rhodamin 6G markiert und in postsinusoidalen Venolen bezüglich ihrer Interaktion mit dem hepatischen Endothel visualisiert und quantitativ analysiert.

Kontrollgruppe: Bei schein-operierten Tieren interagierten nur wenige Leukozyten mit dem hepatischen Endothel. Nur  $1,2 \pm 0,1$  [1/s/mm] Leukozyten rollten an der Endothelzelloberfläche entlang, permanent adhärenente Leukozyten wurden nicht beobachtet ( $0 \pm 0$  [1/mm<sup>2</sup>]).

I/R-Gruppen: Nach 30-minütiger Ischämie gefolgt von 30 min Reperfusion wurde ein geringer Anstieg der Anzahl rollender ( $2,6 \pm 0,4$  [1/s/mm]) und permanent adhärenenter ( $67,8 \pm 5,1$  [1/mm<sup>2</sup>]) Leukozyten gegenüber der Kontrollgruppe registriert, der nach 60-minütiger Ischämie weiter zunahm ( $6,5 \pm 0,5$  [1/s/mm] bzw.  $224,3 \pm 36,7$  [1/mm<sup>2</sup>]).

Nach 90 min Ischämie war die Anzahl rollender ( $13,8 \pm 1,1$  [1/s/mm]) und permanent adhärenenter Leukozyten ( $344,5 \pm 13,1$  [1/mm<sup>2</sup>]) signifikant erhöht. Obwohl die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion auch bei zunehmender Reperusionszeit tendenziell vermehrt auftrat, war diese Entwicklung nicht signifikant (Tab. 8).

**Tab.8.** Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bei unterschiedlicher Ischämie- und Reperfusionzeit

<b>Reperfusionzeit [min]</b>			
<b>Ischämiezeit [min]</b>	30	120	240
Rollende Leukozyten [1/s/mm]			
30	2,6±0,4	2,9±0,3	4,2±0,4
60	6,5±0,5	8,5±1,5	7,6±0,3
90	13,8±1,1*	15,1±0,9	15,6±1,6
Adhärenente Leukozyten [1/mm <sup>2</sup> ]			
30	67,8±5,2	99,0±12,6	110,8±5,8
60	224,3±36,7	250,5±38,5	199,0±7,2
90	344,5±13,1*	372,2±21,8	355,3±27,7

#### **4.1.3.3. Sinusoidale Perfusion**

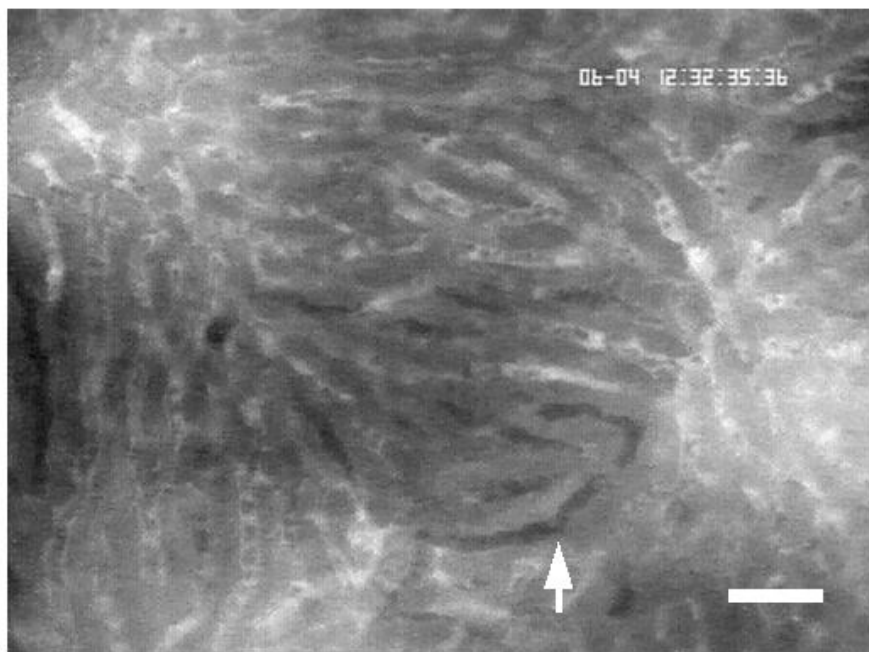
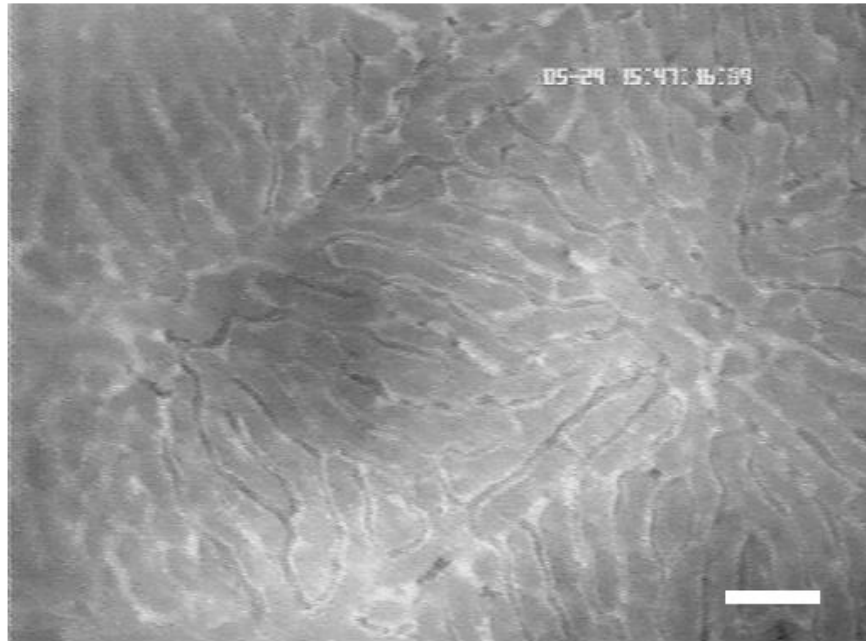
In der Kontrollgruppe betrug die sinusoidale Perfusionsrate im periportalen Anteil des Azinus 93±1 [%], im midzonalen 93±1 [%] und im perizentralen 94±1 [%]. Nach 30 min Ischämie und 30 min Reperfusion wurde keine signifikante Änderung der sinusoidalen Perfusion im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Nach 60-minütiger Ischämie lag die Anzahl der perfundierten Sinusoide bei 85±3 [%] in der periportalen Zone (pp), bei 79±1 [%] in der midzonalen Zone (mz) und bei 83±2 [%] in der perizentralen Zone (pz). Nach 90 min Ischämie fand sich eine signifikante Reduktion gegenüber den schein-operierten Tieren (pp: 71±2 [%], mz: 71±1 [%], pz: 70±1 [%]). Die Ergebnisse zur Abhängigkeit der

sinusoidalen Perfusion von der Reperfusiondauer demonstrieren, daß sowohl nach 120 min als auch nach 240 min Reperfusion keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vorlagen (Abb. 7; Tab. 9).

**Tab. 9.** *Perfusionsrate in den Sinusoiden in [%]*

Ischämiezeit [min]	Reperusionszeit [min]								
	30			120			240		
	pp	mz	pz	pp	mz	pz	pp	mz	pp
sham	93±1	93±1	94±1	-	-	-	-	-	-
30	90±1	90±1	90±2	89±2	90±2	90±2	84±1	85±1	84±3
60	83±2	79±1	85±3	81±3	82±1	83±2	78±2	79±1	82±3
90	70±1*	71±1*	71±2*	70±1	72±1	75±1	72±3	71±1	70±2

\*  $p < 0,05$  vs. Sham. Azinussegmente: pp=periportal, mz=midzonal, pz=perizentral.



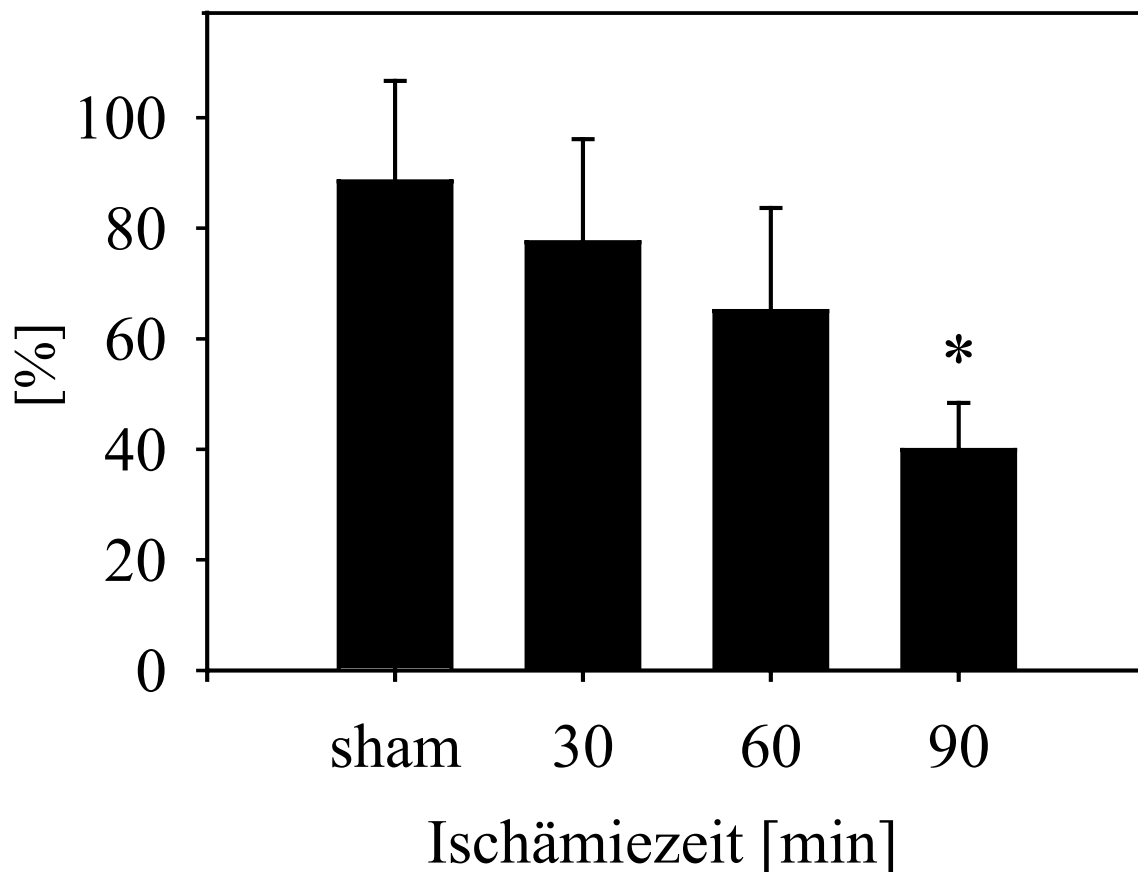
**Abb. 7.** Intravitalmikroskopische Aufnahmen der hepatischen Mikrozirkulation unter Kontrollbedingungen (oben) und nach 90 min Ischämie/30 min Reperfusion (unten). Auf dem unteren Bild sind nicht-perfundierte Sinusoide als Hinweis auf eine verminderte sinusoidale Perfusion zu erkennen (Pfeil). Vergrößerung x500. Balkenlänge 50  $\mu\text{m}$ .

#### ***4.1.3.4. Erythrozytenfließgeschwindigkeit***

Da die Blutfließgeschwindigkeit in den hepatischen Mikrogefäßen die Thrombozyten- bzw. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beeinflussen kann, wurde diese in allen Versuchen gemessen. Sie lag unter Kontrollbedingungen bei  $0,7 \pm 0,1$  [mm/s] in Sinusoiden, bei  $1,5 \pm 0,2$  [mm/s] in Venolen und bei  $1,6 \pm 0,1$  [mm/s] in Arteriolen. Nach I/R wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gefunden.

#### ***4.1.4. Thrombozytenzahl***

Die Thrombozytenzahl wurde im Vollblut der Tiere vor Ischämieinduktion und nach I/R bestimmt. Die Änderungen der systemischen Thrombozytenzahl in Abhängigkeit von der Ischämie sind in Abb. 8 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Reduktion der Thrombozytenzahl nach 90-minütiger Ischämie bei 30 min Reperfusion.



**Abb. 8.** Änderung der Thrombozytenzahl im Vollblut nach I/R im Vergleich zur Kontrolle. Darstellung in [%] von den Werten vor Ischämieinduktion. Reperfusionzeit 30 min.  $MW \pm SEM$ , \*  $p < 0,05$  vs. Sham,  $n=7$  bei I 30 min/R 30 min und I 90 min/R 30 min,  $n=3$  bei I 60 min/R 30 min.

#### 4.1.5. Leberenzyme

Als Maß für den hepatozellulären Schaden wurden die Aktivitäten der Enzyme GOT und GPT im Serum bestimmt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der intravitalmikroskopischen Untersuchung waren die Aktivitäten der Leberenzyme in der Kontrollgruppe und nach 30 min Ischämie nicht erhöht. Im Gegensatz dazu wurde ein signifikanter Anstieg der GOT- und GPT-Aktivitäten nach 90 min Ischämie und 30 min Reperfusion beobachtet (Tab. 10). Bei Verlängerung der Reperfusionzeit fanden sich tendenziell gesteigerte Enzymaktivitäten gegenüber kürzeren Reperfusionzeiten (Tab. 10).

**Tab. 10.** Aktivitäten der GOT und GPT im Serum unter Kontrollbedingungen und nach I/R [IU/L]

Ischämiezeit [min]	Reperfusionzeit [min]		
	30	120	240
GOT [IU/L]			
sham	302,8±39,9	-	-
30	349,8±51,0	603,6±15,3	649,6±45,8
60	420,1±11,9	964,2±492,4	1021,7±289,3
90	2369,6±458,4*	1509,6±381,2	2903,6±1651,6
GPT [IU/L]			
sham	118,6±19,2	-	-
30	204,4±24,1	438,9±104,6	345,8±77,7
60	419,3±42,1	831,6±437,7	598,3±45,4
90	2329,3±325,7*	1214,0±702,6	4490,7±2666,6

\*  $p < 0,05$  vs. Sham.

## **4.2 Die Bedeutung von P-Selektin für die Thrombozyten-Endothelzellen-Interaktion nach hepatischer I/R**

Im zweiten Teil der Studie wurde die Rolle von endothelialelem vs. thrombozytärem P-Selektin für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion und den mikrovaskulären Schaden nach hepatischer I/R analysiert.

### **4.2.1. Makrohämodynamik**

In allen Versuchsgruppen waren über den gesamten Verlauf des Experiments keine signifikanten Änderungen des mittleren arteriellen Blutdrucks zu beobachten (Tab. 11).

**Tab. 11.** Mittlerer arterieller Blutdruck in [mmHg]

<b>Gruppe</b>	<b>Baseline</b>	<b>Ischämie</b>	<b>Reperfusion</b>
sham	94±3	-	-
I/R CD62P+/+	99±3	99±2	98±2
I/R CD62P-/- Endothel und CD62P-/- applizierte Thrombozyten	95±2	94±1	95±1
I/R CD62P-/- applizierte Thrombozyten	91±2	93±3	92±3
I/R CD62P-/- Endothel	95±2	95±2	95±2



#### ***4.2.2. Körperkerntemperatur***

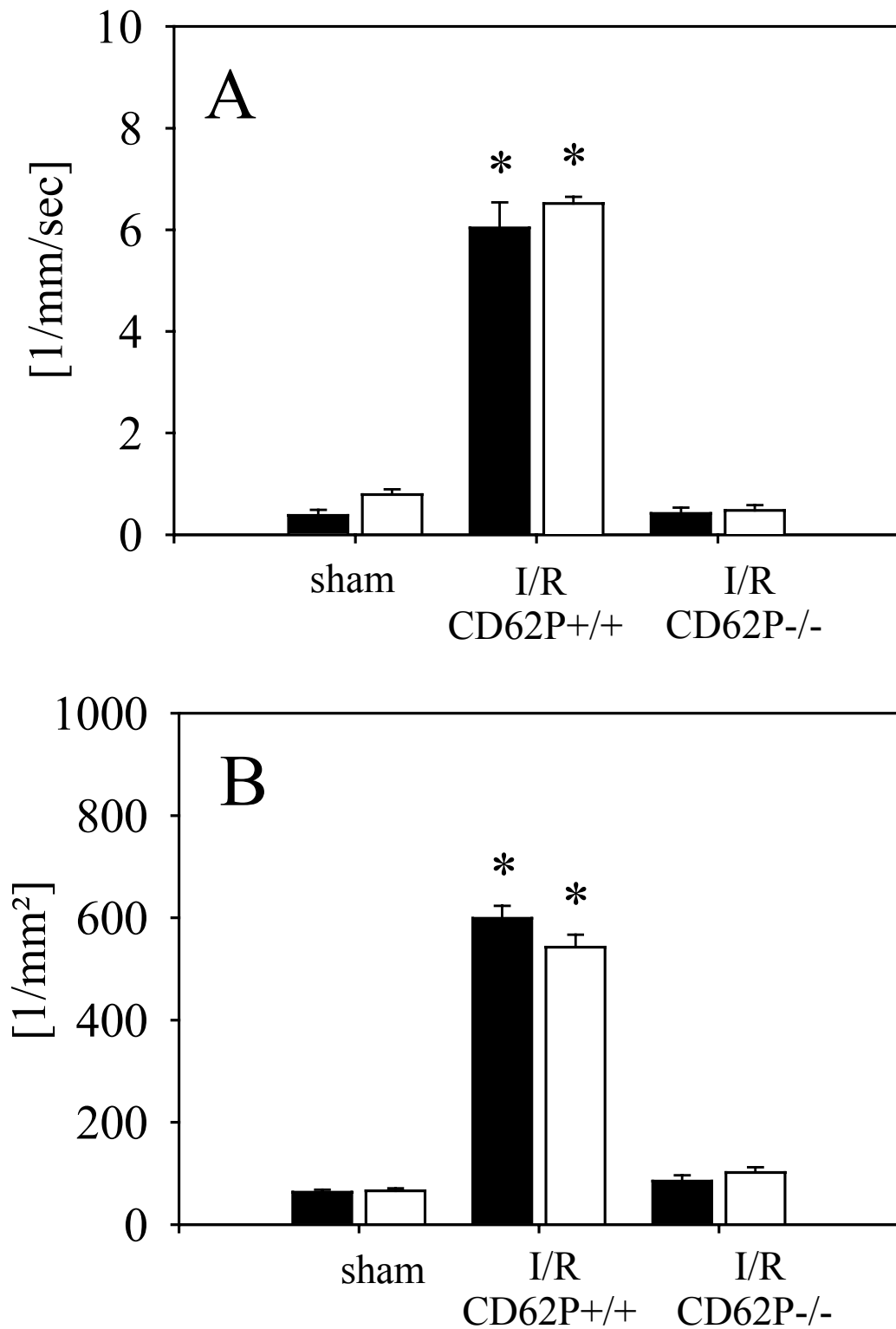
Bei der Messung der Körperkerntemperatur wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen registriert. Die Temperatur ließ sich während des gesamten Versuchsablaufs konstant zwischen 36°C und 37°C halten.

#### ***4.2.3. Mikrozirkulation***

##### ***4.2.3.1. Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion.***

In dieser Versuchsreihe wurden Thrombozyten von Wildtyp- bzw. P-Selektin-defizienten Tieren isoliert und intraarteriell Wildtyp- bzw. P-Selektin-defizienten Mäusen appliziert. In den schein-operierten Tieren wurden keine rollenden Thrombozyten beobachtet. Wie schon gezeigt, fand sich in den Wildtyp-Tieren ein signifikanter Anstieg der Anzahl rollender Rhodamin 6G-markierter Wildtyp-Thrombozyten in Arteriolen und Venolen nach 90 min Ischämie. Nach der Applikation von P-Selektin-defizienten Thrombozyten in P-Selektin-defiziente Versuchstiere wurde jedoch kein Thrombozytenrollen beobachtet (Abb. 9A).

In ähnlicher Weise wurden in der Kontrollgruppe nur vereinzelt permanent adhärenente Thrombozyten beobachtet. Nach I/R wurde eine deutliche Zunahme der Anzahl fest adhärenente Thrombozyten registriert, wenn sowohl die Versuchstiere als auch die applizierten Thrombozyten P-Selektin exprimierten. Im Gegensatz dazu zeigte sich keine Thrombozytenadhäsion nach der Applikation P-Selektin-defizienter Thrombozyten in P-Selektin-defizienten Versuchstieren (Abb. 9B).



**Abb. 9.** Anzahl rollender (A) und adhärenter (B) Thrombozyten in präsinusoidalen Arteriolen (■) und postsinusoidalen Venolen (□) unter Kontrollbedingungen und nach I/R.  $MW \pm SEM$ , \*  $p < 0,05$  vs. Sham.

Da P-Selektin nicht nur in Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen sondern auch in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten gespeichert vorliegt, wurde die Bedeutung des endothelialen P-Selektins im Vergleich zum thrombozytären P-Selektin für die postischämische Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion analysiert. Hierfür wurden zwei zusätzliche Gruppen nach I/R untersucht. Die Anzahl rollender und adhärenter Thrombozyten war in Wildtyp-Tieren nach der Applikation von P-Selektin-defizienten Thrombozyten signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Im Gegensatz dazu wiesen P-Selektin-defiziente Tiere nach der Applikation von Wildtyp-Thrombozyten ebenfalls kein Rollen und keine Adhärenz auf. Dieses Ergebnis fand sich sowohl in Arteriolen als auch in postsinusoidalen Venolen (Tab.12).

**Tab. 12.** Die Rolle von endothelialem vs. thrombozytärem P-Selektin für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach I/R der Leber

		sham	I/R CD62P-/- Thrombozyten	I/R CD62P-/- Endothel
Anzahl rollender Thrombozyten [1/mm/sec]	Arteriolen	0,4±0,1	6,8±0,4*	0,4±0,1
	Venolen	0,8 ±0.1	6,3±0.7*	0,5±0,1
Anzahl adhärenter Thrombozyten [1/mm <sup>2</sup> ]	Arteriolen	63,6±4,8	495,4±18,8*	85,4±11,4
	Venolen	66,0±4,6	523,5±31,4*	102,2±10,0

\*  $p < 0,05$  vs. Sham

Im Gegensatz zu Arteriolen und Venolen war in den Sinusoiden der P-Selektin-defizienten Empfängertiere die Anzahl adhärenter Thrombozyten im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant erhöht (Tab. 13).

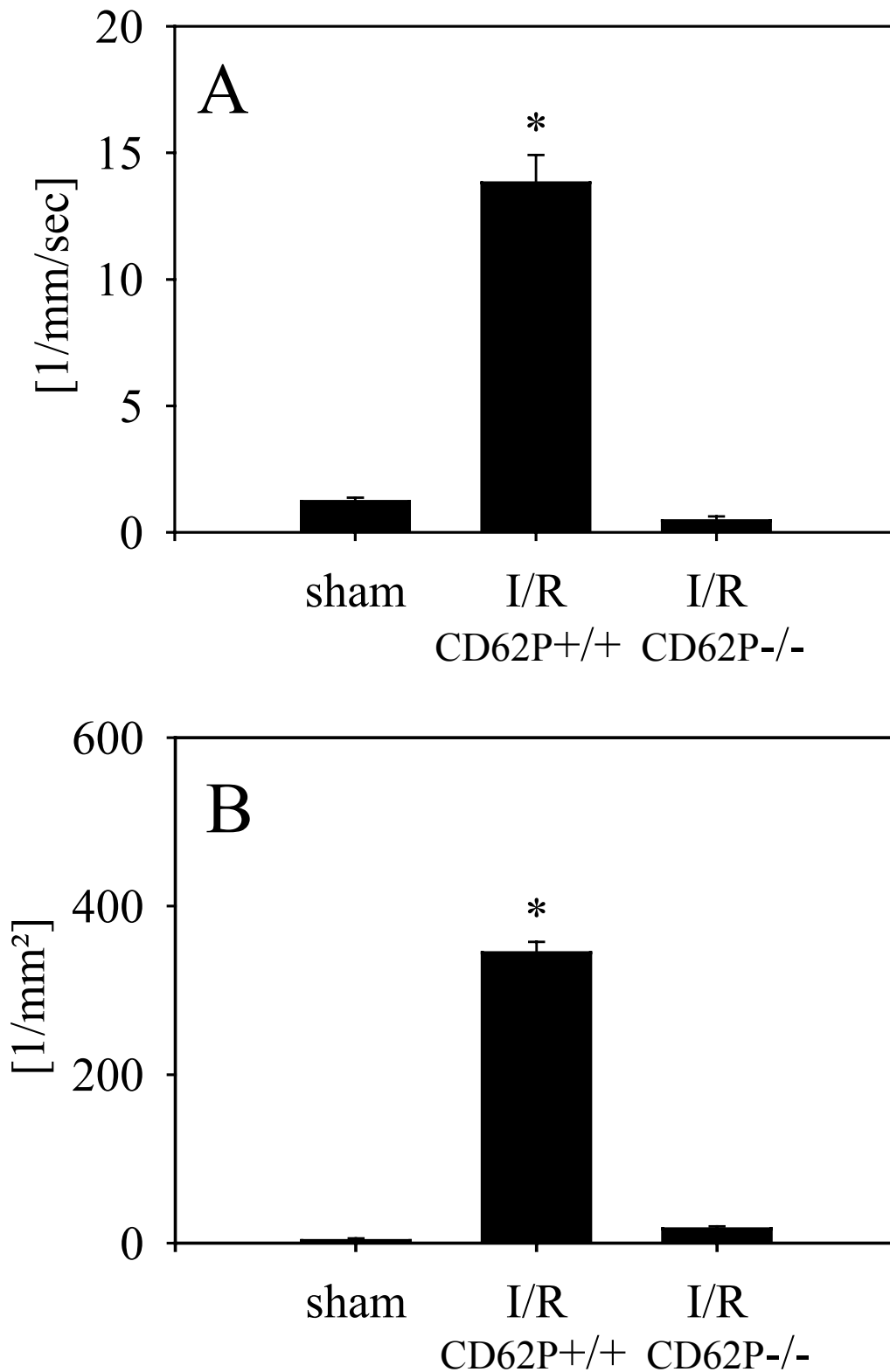
**Tab. 13.** Anzahl permanent adhärenter Thrombozyten in den Sinusoiden nach I/R

Gruppe	sham	I/R	I/R CD62P-/- Thrombozyten und Endothel	I/R CD62P-/- Thrombozyten	I/R CD62P-/- Endothel
n/Azinus	2,1±0,2	11,5±0,6*	7,7±0,6*	12,0±0,5*	8,3±0,8*

\*  $p < 0,05$  vs. Sham.

#### 4.2.3.2. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

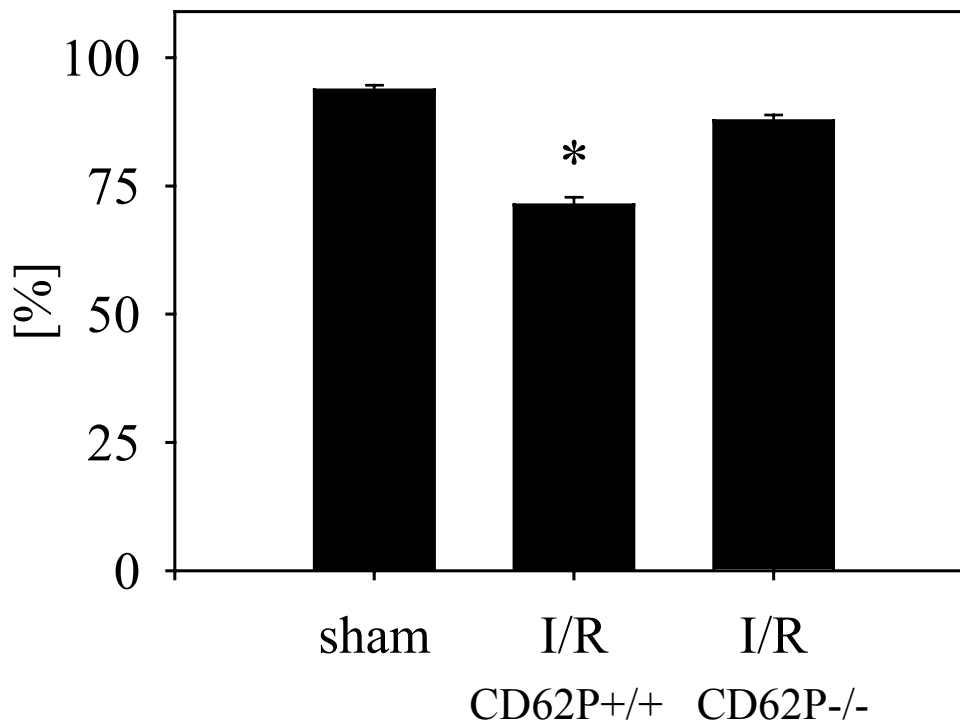
Zusätzlich wurde die Bedeutung von P-Selektin für die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nach hepatischer I/R untersucht. Die Anzahl rollender und adhärenter Leukozyten nahm nach 90 min Ischämie in den P-Selektin-positiven Tieren signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe zu. Im Gegensatz dazu wurde bei den Tieren, welche auf der Endotheloberfläche kein P-Selektin exprimierten, nach 90-minütiger Ischämie kein Leukozytenrollen und keine Adhärenz beobachtet (Abb. 10).



*Abb. 10. Anzahl rollender (A) und permanent adhärenter (B) Leukozyten in postsinusoidalen Venolen unter Kontrollbedingungen und nach I/R.  $MW \pm SEM$ , \*  $p < 0,05$  vs. Sham*

#### 4.2.3.3. Sinusoidale Perfusion

Die sinusoidale Perfusion wurde als Parameter des mikrovaskulären Schadens untersucht. Während die sinusoidale Perfusion in der Kontrollgruppe bei  $93 \pm 2$  [%] lag, war diese nach 90 min Ischämie gegenüber der Kontrolle signifikant reduziert ( $71 \pm 2$  [%]). Im Gegensatz dazu war dieses sinusoidale Perfusionsdefizit in P-Selektin-defizienten Tieren nicht zu beobachten. (Abb. 11).

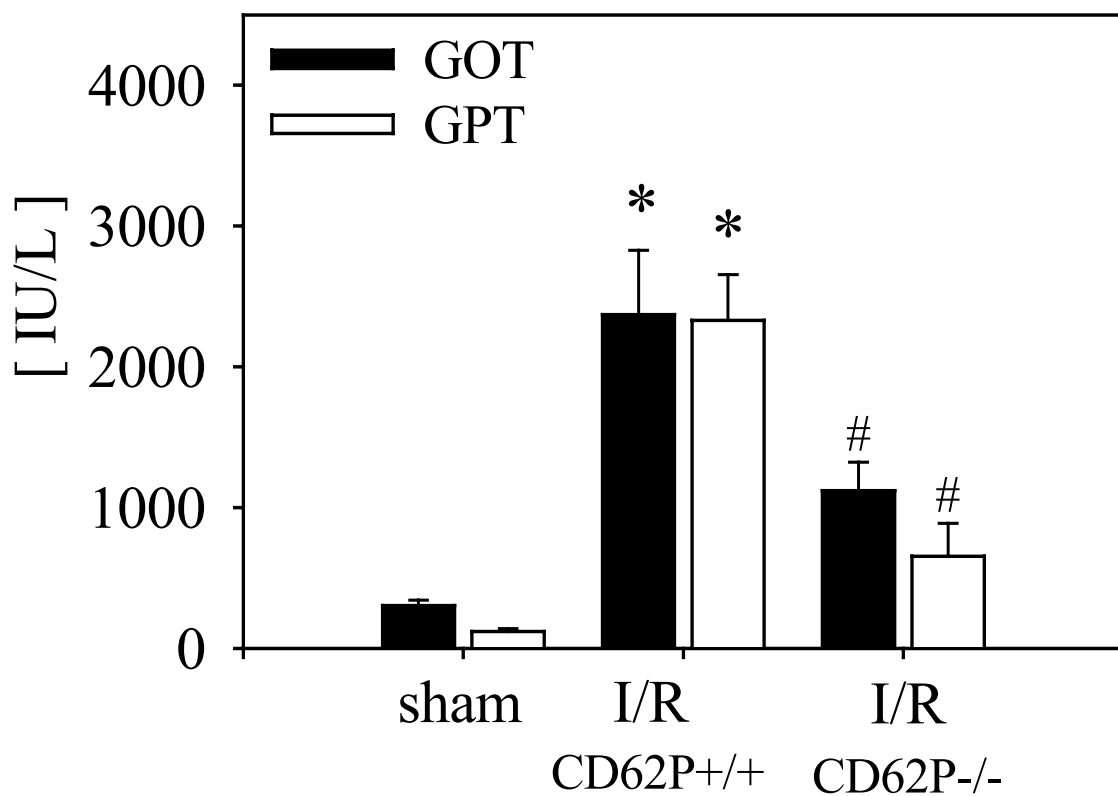


**Abb. 11.** Sinusoidale Perfusionsrate unter Kontrollbedingungen und nach I/R.  $MW \pm SEM$ , \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. I/R.

#### 4.2.4. Leberenzyme

Um zu überprüfen, inwiefern die reduzierte Interaktion der Thrombozyten und Leukozyten mit dem hepatischen Endothel einen Einfluß auf den hepatozellulären Schaden nimmt,

wurden die Leberenzyme GOT und GPT bestimmt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Mikrozirkulationsanalyse fand sich in den P-Selektin-defizienten Tieren nach I/R eine reduzierte Enzymaktivität im Vergleich zu der Wildtyp-I/R-Gruppe. (Abb. 12).

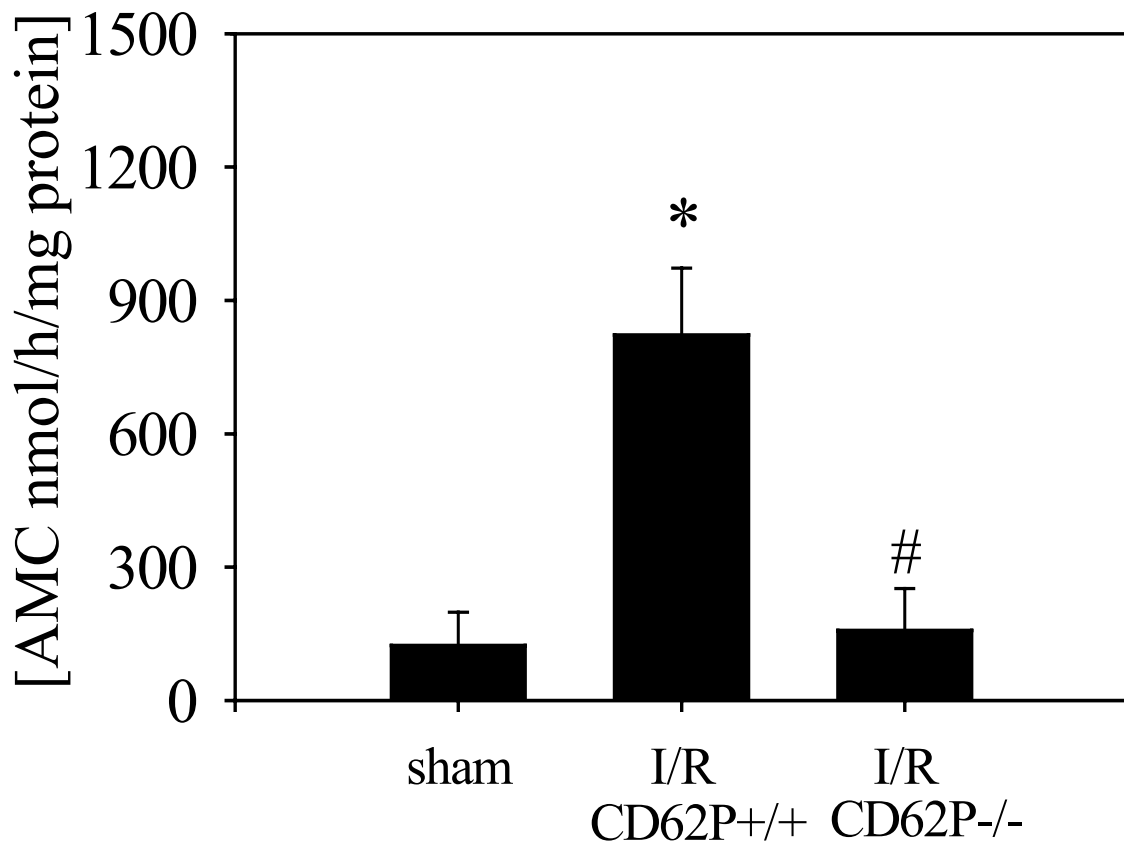


**Abb. 12.** Serumaktivitäten der Leberenzyme unter Kontrollbedingungen und nach I/R. Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. I/R.

#### 4.2.5. Hepatozelluläre Apoptose

Die hepatozelluläre Apoptose wurde mittels Bestimmung der Caspase-3-Aktivität im Lebergewebe, TUNEL-Färbung und *in vivo* Analyse der Kernkondensation und DNA-

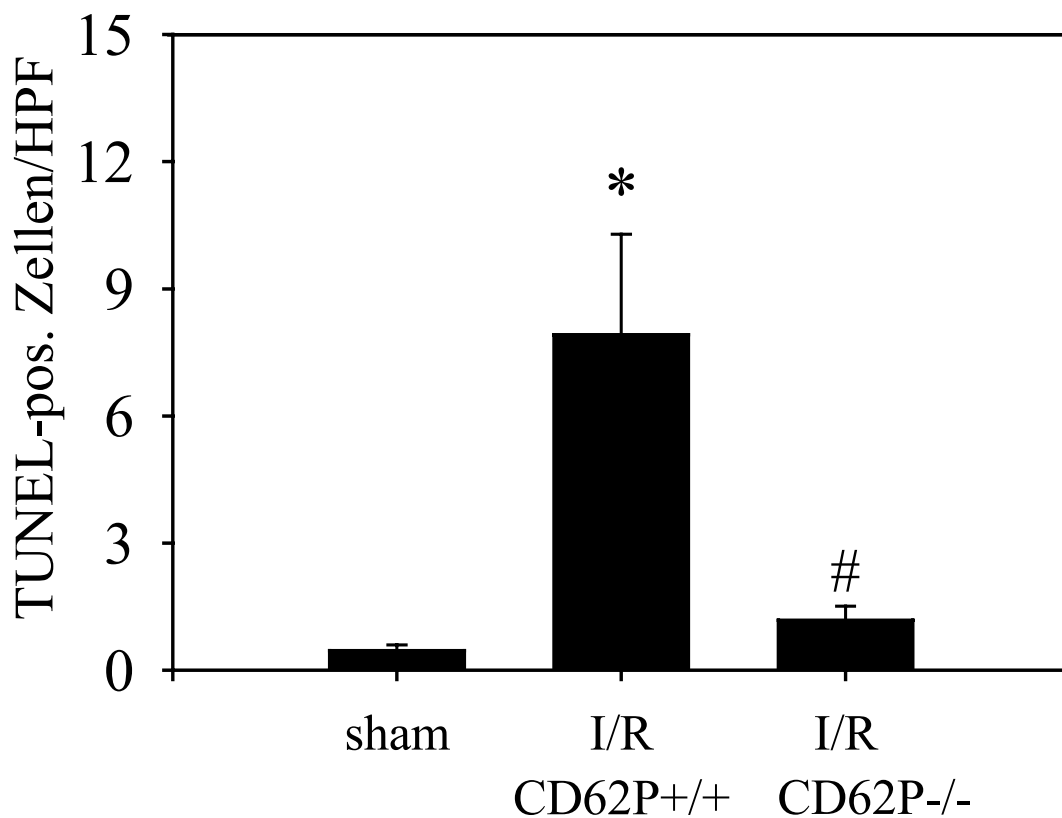
Fragmentation untersucht. Die Caspase-3-Aktivität betrug in der Kontrollgruppe  $124 \pm 75$  [nmol/h/mg Protein]. Nach 90 min Ischämie und 60 min Reperfusion fand sich ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität in den Wildtyp-Tieren ( $822 \pm 151$  [nmol/h/mg Protein]). Im Gegensatz dazu wiesen P-Selektin-defiziente Tiere eine signifikant reduzierte Caspase-3-Aktivität ( $157 \pm 94$  [nmol/h/mg Protein]) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nach I/R auf (Abb. 13).



**Abb. 13.** Caspase-3-Aktivität im Gewebe unter Kontrollbedingungen und nach I/R.  $MW \pm SEM$ , \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. I/R.

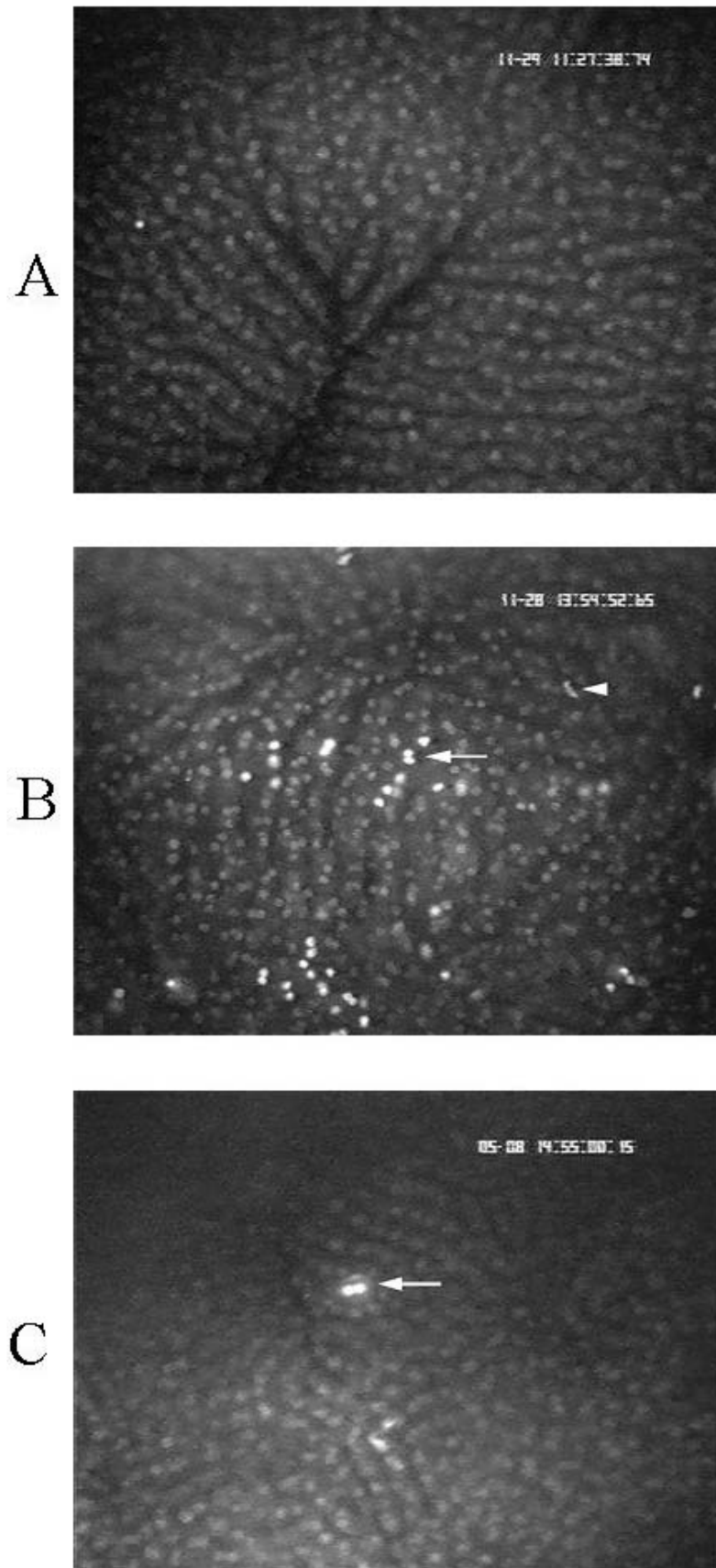


TUNEL-positive Zellen wurden mittels Lichtmikroskopie pro Gesichtsfeld (high power field-HPF) in 10 Feldern gezählt. Während in schein-operierten Tieren nur vereinzelt TUNEL-positive Zellen ( $0,5 \pm 0,1$  [Zellen/HPF]) registriert wurden, stieg die Anzahl TUNEL-positiver Hepatozyten in den Wildtyp-Mäusen nach I/R um das 14-fache an. In der Gruppe, in welcher P-Selektin-defiziente Empfängertiere verwendet wurden, fanden sich hingegen nur wenige apoptotische Hepatozyten im postischämischen Gewebe (Abb. 14). Es ist zu betonen, daß in unseren Untersuchungen nach I/R weder in Wildtyp- noch in P-Selektin-defizienten Tieren TUNEL-positive Endothelzellen beobachtet wurden.



**Abb. 14.** Anzahl TUNEL-positiver Hepatozyten im Gewebe pro Gesichtsfeld in der Kontrollgruppe und nach I/R. (Vergrößerung  $\times 400$ ).  $MW \pm SEM$ ,  $*p < 0,05$  vs. Sham,  $\#p < 0,05$  vs. I/R.

Mittels intravitalmikroskopischer Untersuchungen nach DNA-Färbung mit Bisbenzamid konnten spezifische Apoptosezeichen (Kernkondensation und Zellen mit fragmentierter DNA) entsprechend den in der Literatur beschriebenen Kriterien<sup>125</sup> dargestellt werden. Während nach I/R im hepatischen Gewebe von Wildtyp-Tieren eine Vielzahl an Zellen mit Kernkondensation und DNA-Fragmentation beobachtet wurde, fanden sich in der Leber P-Selektin-defizienter Tiere nach I/R nur vereinzelt Zellen mit apoptotischen Kernen (Abb. 15).



**Abb. 15:** Intravitalmikroskopische Darstellung der DNA-Fragmentation (Pfeile) und Kernkondensation (Pfeilkopf) nach i.v. Applikation von Bisbenzamid (A: Kontrollgruppe, B: nach der I/R in Wildtyp Tieren, C: nach der I/R in CD62P-/- Tieren). Vergrößerung x500.

### **4.3. Einfluß von Thrombozyten auf den hepatischen I/R-Schaden**

Im dritten Teil der Arbeit wurden die Rolle von Fibrinogen für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion und die differentielle Bedeutung von Thrombozyten und Leukozyten bei der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens untersucht.

#### **4.3.1. Mittlerer arterieller Blutdruck**

Der MAP blieb bei allen Tieren stabil und zeigte über die gesamte Dauer des Experiments keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Ausgangswerten (Tab. 14).

**Tab. 14.** Mittlerer arterieller Blutdruck in [mmHg]

<b>Gruppe</b>	<b>Baseline</b>	<b>Ischämie</b>	<b>Reperfusion</b>
sham	94±3	-	-
I/R	99±3	99±2	98±2
I/R-antiFbg-AK	98±2	97±2	94±1
I/R-IgG	102±3	100±2	97±4

#### **4.3.2. Mikrozirkulation**

##### **4.3.3.1. Fibrinbindung am hepatischen Endothel**

Die Fibrin(ogen)bindung am hepatischen Endothel wurde *in vivo* mittels intravitaler Mikroskopie untersucht. In Tieren ohne I/R war Alexa-488-markiertes Fibrinogen homogen im Plasma verteilt. Weder am Endothel präsinusoidaler Arteriolen oder Sinusoide noch an dem postsinusoidaler Venolen wurde eine Fibrinablagerung registriert.

A



B

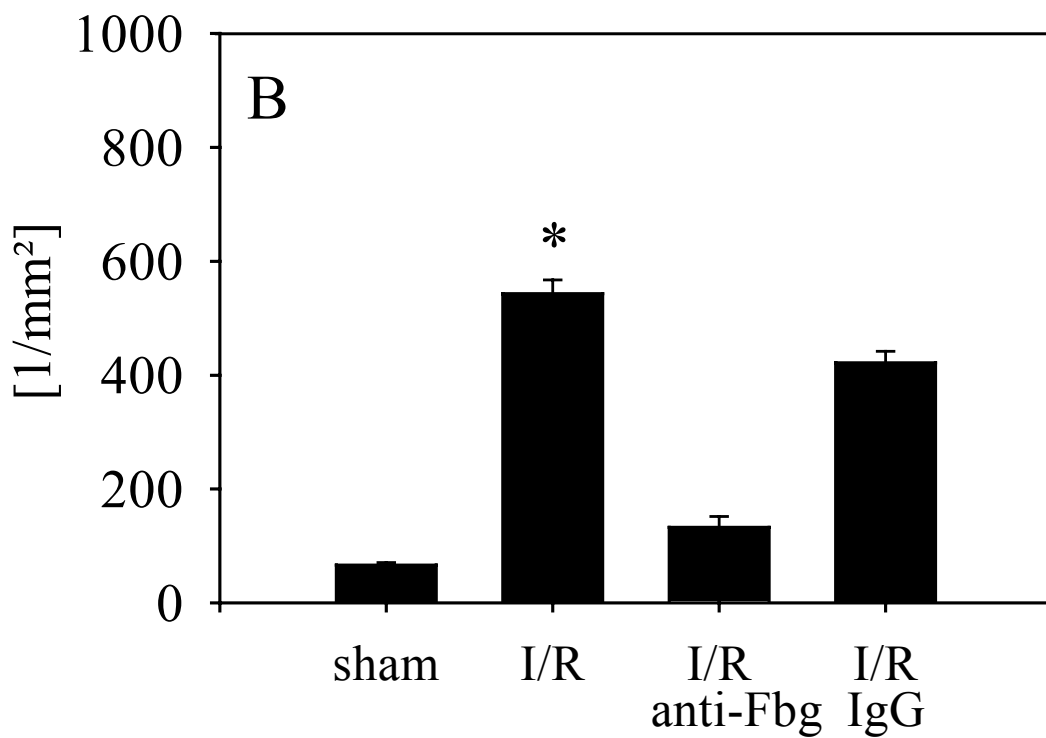
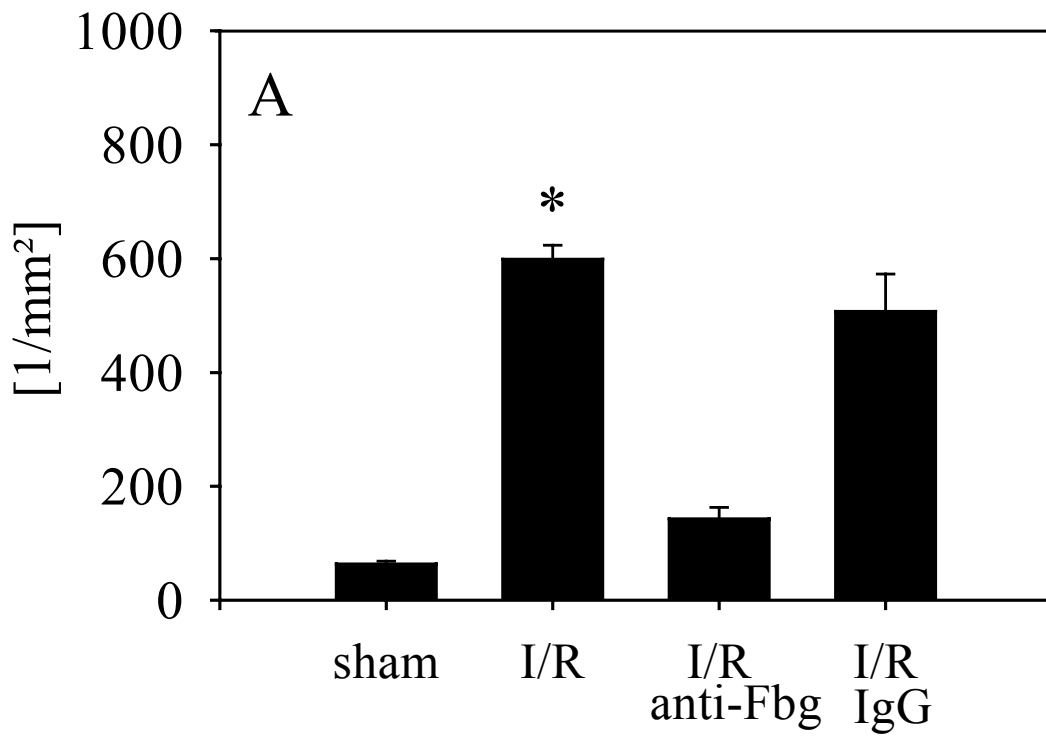


**Abb. 16.** Intravitalmikroskopische Aufnahmen nach Applikation von Alexa-488-markiertem Fibrinogen. Während unter Kontrollbedingungen keine Fibrinbindung (A) beobachtet wurde, induzierte hepatische I/R die Akkumulation von Fibrin (B) in hepatischen Mikrogefäßen. Vergrößerung x500. n=3.

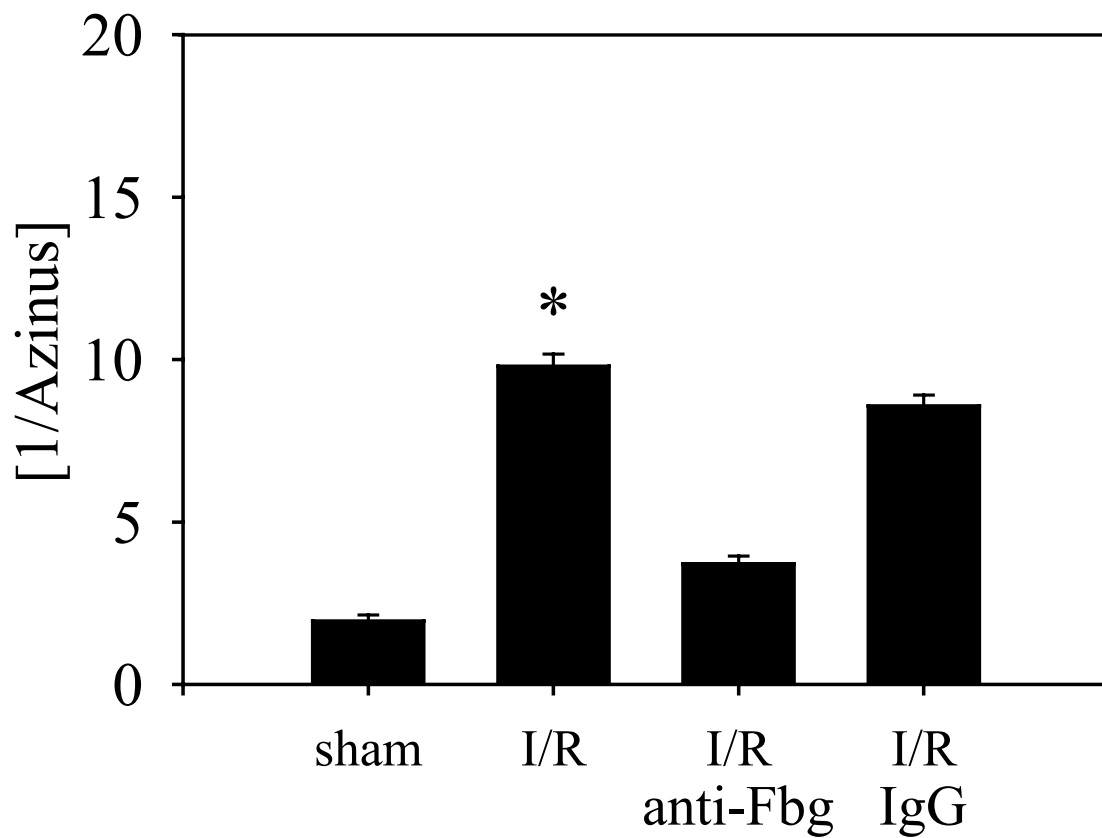
Im Gegensatz dazu induzierte hepatische I/R die Ablagerung von Alexa-488-konjugiertem Fibrin(ogen) an die Oberfläche des Endothels hepatischer Arteriolen, Sinusoide und Venolen (Abb. 16).

#### ***4.3.3.2. Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion***

Um die Bedeutung von Fibrinogen für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach hepatischer I/R zu untersuchen, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Fibrinogen direkt zum Beginn der Reperfusionphase i.v. appliziert. Unter Kontrollbedingungen wurde nur eine geringere Anzahl rollender und permanent adhärenter Thrombozyten registriert. Im Gegensatz dazu fand sich ein signifikanter Anstieg der Anzahl rollender und adhärenter Thrombozyten nach 90 min Ischämie. Nach der Applikation des Antifibrinogen-Antikörpers war die Anzahl permanent adhärenter Thrombozyten in präsinusoidalen Arteriolen ( $143,1 \pm 19,8$  [1/mm<sup>2</sup>]) (Abb. 17A), Sinusoiden ( $3,7 \pm 0,3$  [1/Azinus]) (Abb. 18) und postsinusoidalen Venolen ( $132,8 \pm 18,7$  [1/mm<sup>2</sup>]) (Abb. 17B) signifikant im Vergleich zur nicht-behandelten I/R-Gruppe reduziert, während sich die Anzahl rollender Thrombozyten nicht änderte. Die Applikation eines Kontrollantikörpers hatte keinen Einfluß auf die I/R-induzierte Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion.



**Abb. 17.** Anzahl permanent adhärenter Thrombozyten in präsinusoidalen Arteriolen (A) und postsinusoidalen Venolen (B) unter Kontrollbedingungen, nach I/R und nach Applikation eines spezifischen Fibrinogenantikörpers (Anti-Fbg, n=7), bzw. eines unspezifischen Antikörpers (IgG, n=4). MW±SEM. \*P<0,05 versus sham.

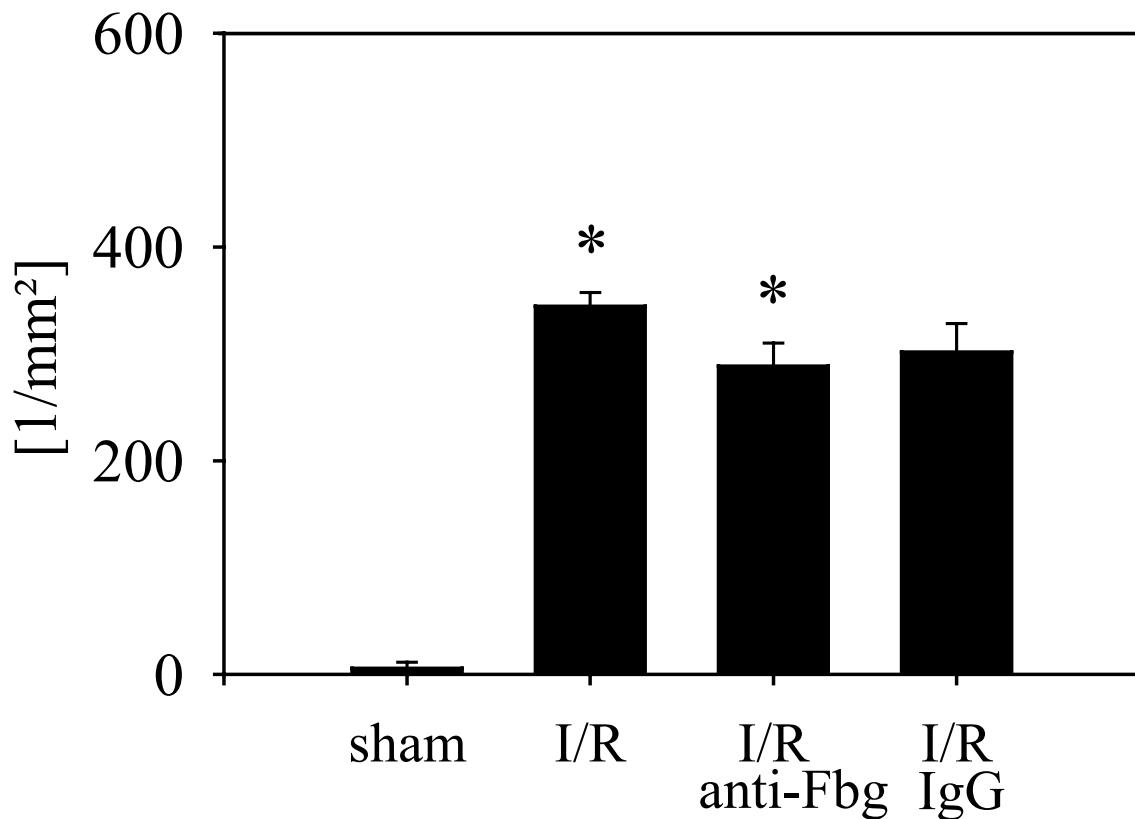


**Abb. 18.** Trombozytenadhäsion in Sinusoiden nach I/R und nach Applikation eines spezifischen Fibrinogenantikörpers ( $n=7$ ) bzw. unspezifischen Kontrollantikörpers ( $n=4$ ).  $MW \pm SEM$ .  $*P < 0,05$  versus sham.



#### 4.3.3.3. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

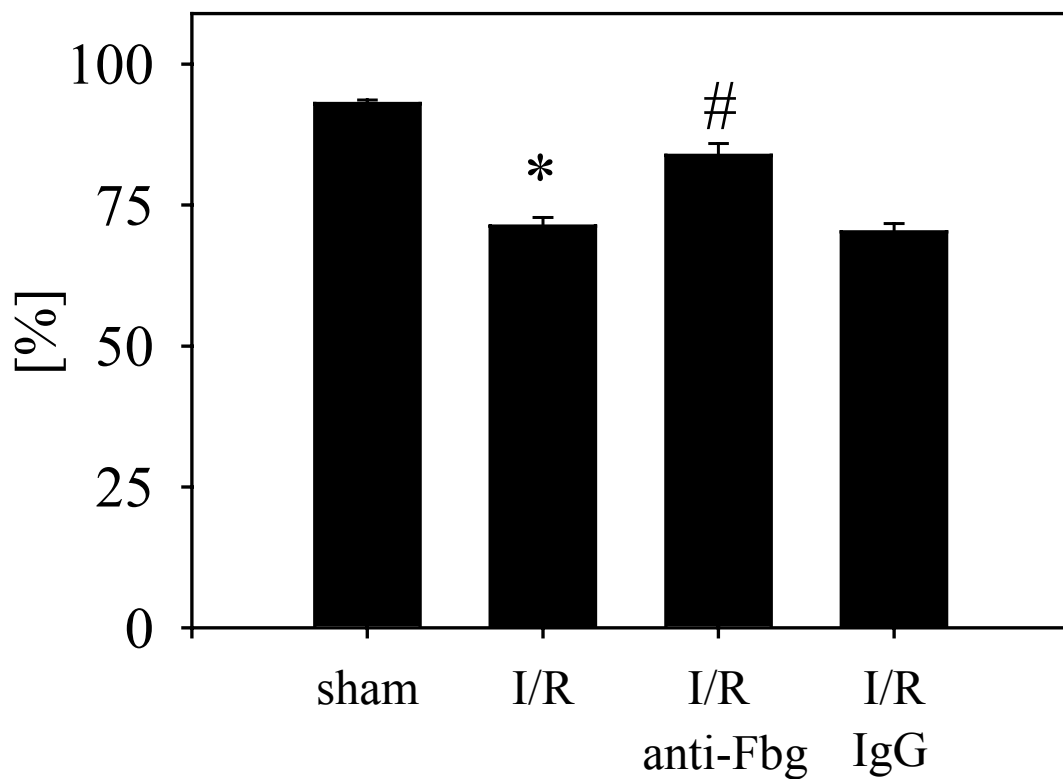
Im Gegensatz zu der signifikanten Reduktion der Thrombozytenadhärenz nach Fibrinogenhemmung war die Anzahl rollender und permanent adhärenter Leukozyten nach der Applikation des Antifibrinogen-Antikörpers mit  $12,8 \pm 1,1$  [1/s/mm] bzw.  $289,6 \pm 22,6$  [1/mm<sup>2</sup>] unverändert hoch. Die Applikation des Kontroll-Antikörpers hatte keine Wirkung auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den postsinusoidalen Venolen (Abb. 19).



**Abb. 19.** Leukozytenadhäsion in postsinusoidalen Venolen nach I/R und nach Applikation eines spezifischen Fibrinogenantikörpers (anti-Fbg, n=7), bzw. eines unspezifischen Kontrollantikörpers (IgG, n=4).  $MW \pm SEM$ . \* $P < 0,05$  versus sham.

#### 4.3.3.4. Sinusoidale Perfusionsrate

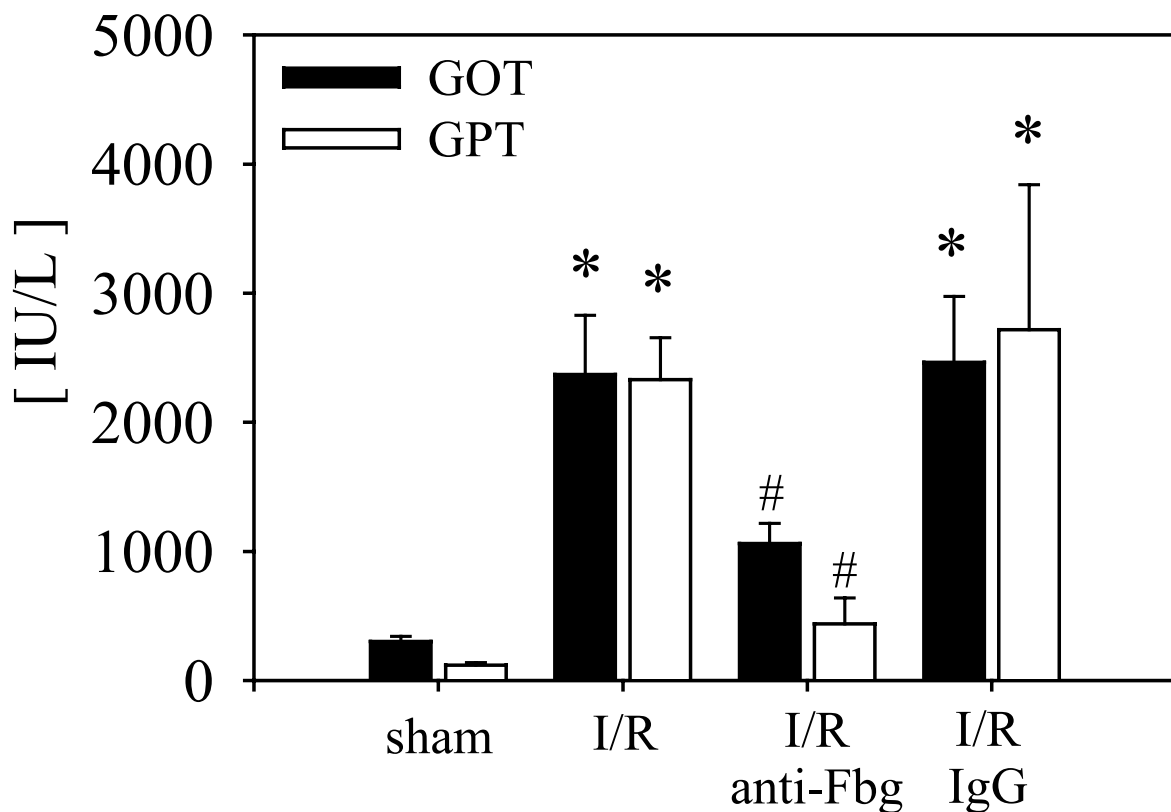
Wie oben erwähnt, war die sinusoidale Perfusion nach 90 min Ischämie und 20 min Reperfusion signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduziert. Nach der Applikation des Antifibrinogen-Antikörpers war das postischämische Perfusionsdefizit signifikant verbessert. Die sinusoidale Perfusionsrate betrug in dieser Gruppe  $85 \pm 2$  [%]. (Abb. 20).



**Abb. 20.** Sinusoidale Perfusionsrate unter Kontrollbedingungen, nach I/R und nach Applikation eines Antifibrinogen-AK bzw. Kontroll-AK.  $MW \pm SEM$  \* $P < 0,05$  vs. sham. #  $p < 0,05$  vs. I/R.

#### 4.3.4. Leberenzyme

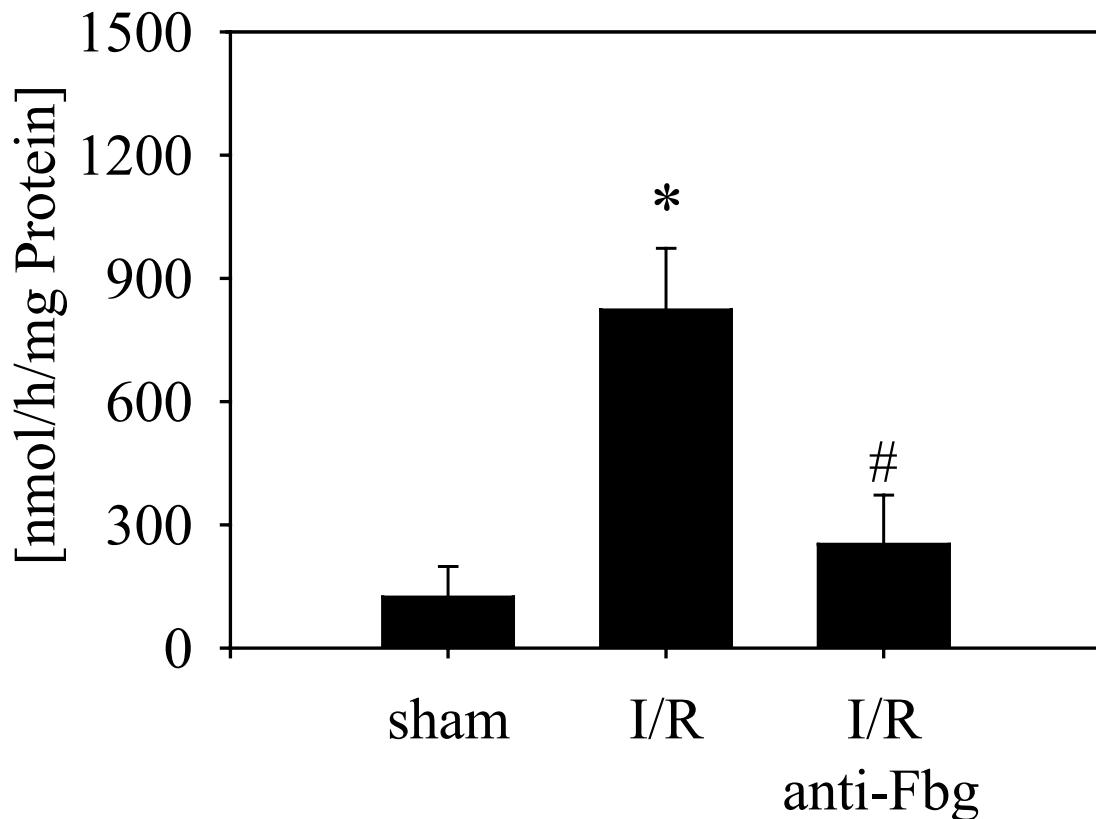
Während in der Kontrollgruppe die Aktivitäten der GOT/GPT nicht erhöht waren (GOT:  $302,8 \pm 39,9$  und GPT:  $118,6 \pm 19,2$  [IU/L]), induzierte I/R einen signifikanten Anstieg der Enzymaktivitäten (GOT:  $2369,6 \pm 458,4$  und GPT:  $2329,7 \pm 325,7$  [IU/L]). Nach der Hemmung der Thrombozytenadhärenz waren die Aktivitäten der GOT und GPT signifikant reduziert (GOT:  $1042,1 \pm 227,6$  [IU/L]; GPT:  $481,1 \pm 201,1$  [IU/L]). Der Kontroll-Antikörper hatte hingegen diesen protektiven Effekt nicht. (Abb. 21).



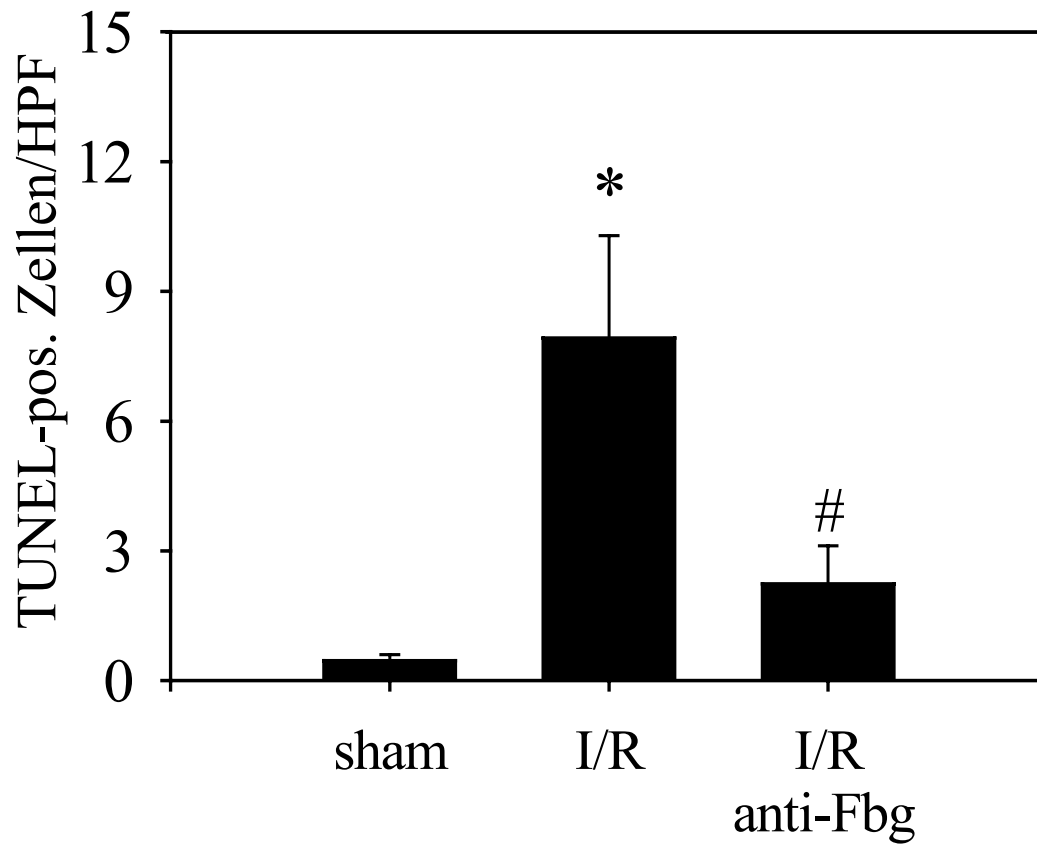
**Abb. 21.** Serumaktivität der Leberenzyme nach I/R und nach Applikation eines spezifischen Fibrinogenantikörpers (anti-Fbg,  $n=7$ ), bzw. eines unspezifischen Antikörpers (IgG,  $n=4$ ).  $MW \pm SEM$ . \* $P < 0,05$  versus sham, # $P < 0,05$  vs. I/R

#### 4.3.5. Hepatozelluläre Apoptose

Der Einfluß der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion auf die Induktion der hepatozellulären Apoptose wurde mittels Bestimmung der Caspase-3-Aktivität und TUNEL-Färbung quantifiziert. In schein-operierten Tieren wurde keine Apoptose-Induktion beobachtet. Nach I/R fand sich hingegen ein signifikanter Anstieg der Caspase-3-Aktivität ( $822 \pm 150$  [nmol/h/mg]) und der Anzahl TUNEL-positiver Hepatozyten ( $7,9 \pm 2,4$  [Zellen/HPF]). Im Gegensatz dazu reduzierte die Hemmung der Thrombozytenadhärenz signifikant die Caspase-3-Aktivität (Abb. 22) ( $251,8 \pm 120,5$  [nmol/h/mg]) und die Anzahl TUNEL-positiver Zellen (Abb. 23).



**Abb. 22.** Caspase-3-Aktivität im Gewebe nach I/R und nach Applikation des Antifibrinogen-AK ( $n=7$ ).  $MW \pm SEM$ , \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. I/R.



*Abb. 23. Anzahl TUNEL-positiver Hepatozyten nach I/R und nach Applikation des Antifibrinogen-AK (n=7). MW  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. I/R.*

## **5. DISKUSSION**

### ***5.1. Modell***

#### ***5.1.1. Versuchstiere***

In der vorliegenden Arbeit wurde die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach hepatischer I/R charakterisiert und die dieser Interaktion zugrundeliegenden Mechanismen näher beschrieben. Die Pathophysiologie des postischämischen I/R-Schadens der Leber ist durch die komplexe Interaktion verschiedenster Systeme und Mechanismen charakterisiert, welche vom intakten Gesamtorganismus abhängig sind und daher am besten in einem Tiermodell untersucht werden können. Vor allem die Analyse der hepatischen Mikrozirkulation nach selektiver Anfärbung unterschiedlicher zellulärer Komponenten mittels Fluoreszenzfarbstoffen, welche aufgrund der potentiellen Toxizität nicht am Menschen verwendet werden können, ist nur im Rahmen eines Tiermodells unter Berücksichtigung systemischer makrohämodynamischer Parameter möglich.

Die Methodik der intravitalmikroskopischen Analyse der Lebermikrozirkulation ist nur am Kleintierorganismus (Maus, Ratte, Hamster) möglich, weil sowohl die Organgröße als auch die Dicke der Leberkapsel den Einsatz der entsprechenden Meßsysteme einschränken. Wir entschieden uns für die Maus, da diese Spezies immunologisch sehr gut charakterisiert ist. Ferner stehen Antikörper zur Verfügung, welche die selektive Untersuchung einzelner Mechanismen der I/R-vermittelten Zell-Zell-Interaktionen erlauben. Zusätzlich lassen sich über die Verwendung von gentechnisch veränderten Tieren singuläre Komponenten auf ihre biologische Signifikanz für die Induktion und Ausprägung des hepatischen I/R-Schadens überprüfen. Darüberhinaus ist das Modell der

isolierten reversiblen lobären Ischämie an der Maus für die Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation gut geeignet und in der Literatur mehrfach beschrieben<sup>7, 12, 162, 196, 68</sup>.

In unserer Studie verwendeten wir die C57BL/6-Maus. Dieser Stamm eignet sich aufgrund seiner Leberanatomie zur intravitalmikroskopischen Untersuchung, da pathophysiologisch relevante Strukturen (Sinusoide, postsinusoidale Venolen, präsinusoidale Arteriolen) bis an die Oberfläche treten und somit gut darzustellen sind. Dies hat insbesondere für die Untersuchung der Arteriolen Bedeutung, da in intravitalmikroskopischen Studien am Mäusedarm eine postischämische Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion sowohl in Arteriolen als auch in Venolen demonstriert wurde<sup>110-112</sup>. Einzig der portalvenöse Zustrom zu den Sinusoiden läßt sich aufgrund der anatomischen Besonderheiten der murinen Leber (tiefliegende portale Gefäße) wegen der limitierten Eindringtiefe der optischen Auflösung unseres Systems von maximal 500 µm nicht visualisieren<sup>120</sup>. Dies muß als systemimmanenter Nachteil akzeptiert werden. Eine intravitalmikroskopische Analyse des portalvenösen Zustroms ist bislang aufgrund dieser Tiefenlimitierung auch von anderen Autoren nicht beschrieben. Sowohl die Konstanz unserer Daten unter Kontrollbedingungen als auch die Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur<sup>7</sup> lassen den Schluß zu, daß mittels des von uns gewählten Mäusestammes (C57BL/6-Maus) Antworten auf die eingangs formulierten Fragen zu erhalten sind.

### ***5.1.2. Chirurgische Präparation***

Nach einer mikrochirurgischen Anlernphase stellte die Präparation eine technisch komplikationsfreie Aufgabe dar. Wie bereits beschrieben<sup>7</sup>, wurde nach medianer Laparotomie eine isolierte reversible Ischämie des linken Leberlappens durchgeführt. Um

das eventuelle Austrocknen bzw. Abkühlen des ischämischen Organs zu verhindern, wurde die Bauchhöhle bei liegendem Gefäßclip mit 2 Nahtreihen verschlossen. Sowohl diese Manipulationen als auch die nachfolgende Auslagerung des linken Leberlappens für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie stellen einen chirurgischen Eingriff dar, der potentielle Konsequenzen für die Durchblutungsregulation anderer intraabdomineller Organe haben kann<sup>1, 51</sup>. Ein daraus erwachsender Einfluß auf die Ergebnisse ist jedoch zu vernachlässigen, da die laparotomiebedingten hämodynamischen Veränderungen im Bereich abdomineller Gefäße im Rahmen der zur Anwendung gekommenen Inhalationsanästhesie unter verbleibender Spontanatmung des Versuchstieres stark abgeschwächt werden<sup>51</sup>. Durch die Verwendung von Modelliermasse auf der Haltevorrichtung wurde die mechanische Obstruktion der afferenten und efferenten Gefäße des ausgelagerten linken Lappens vermieden, was durch wiederholte und vorsichtige Inspektion bestätigt werden konnte.

Während der Reperfusionphase blieb das Abdomen zwar geöffnet, eventuelle Flüssigkeitsverluste aufgrund von Austrocknen wurden durch Auflegen einer Cellophanfolie bzw. durch das Deckglas für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie auf ein Minimum reduziert. Darüberhinaus wurde den Tieren kontinuierlich 0,2 ml/h/g KG physiologischer Kochsalzlösung infundiert, um die Flüssigkeitsbilanz ausgeglichen zu halten.

### ***5.1.3. Thrombozytenseparation***

Zur Darstellung der Thrombozyten durch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie war es notwendig, die Zellen mit dem Fluoreszenzmarker Rhodamin-6G zu markieren. Im



Unterschied zu Leukozyten, die man *in vivo* durch i.v. Injektion von Rhodamin-6G anfärben kann, mußten die Thrombozyten isoliert und *ex vivo* markiert werden, um eine ausreichende Beladung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff zu erzielen.

Das in der vorliegenden Untersuchung zur Anwendung gelangte Protokoll zur Thrombozytenisolierung bei gleichzeitiger Markierung mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes entspricht dem in der Literatur ausführlich beschriebenen Vorgehen<sup>111</sup>. Die Qualität unserer Thrombozytenpräparation wurde mittels *fluorescence activated cell sorter* (FACS) auf die Expression des thrombozytären Aktivationsmarkers P-Selektin<sup>173</sup> auf der Oberfläche sowohl der isolierten Zellen als auch im Vollblut gemessen. Des Weiteren wurde die Fähigkeit der Thrombozyten, auf einen entsprechenden Stimulus zu reagieren, überprüft, indem in einem weiteren Ansatz den isolierten Zellen Thrombin als Aktivator zugesetzt wurde. Hier fand sich, daß die Thrombozyten nach Isolierung nur unwesentlich mehr P-Selektin auf ihrer Oberfläche im Vergleich zu Kontrolle exprimierten. Nach Stimulation mit Thrombin hingegen war diese Expression bis um das 6-fache gesteigert. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß die Präparation keine wesentliche Aktivierung der Thrombozyten induziert hat und die Zellen eine ausreichende Fähigkeit innehatten, bei entsprechender biologischer Aktivierung Zell-Zell-Interaktionen einzugehen.

#### **5.1.4. Experimentelles Protokoll**

Um die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach hepatischer I/R zu charakterisieren, wurden zunächst systematische Untersuchungen zum Einfluß der Ischämie- und Reperfusionzeit durchgeführt. Hinzu wurden Ischämiezeiten von 30, 60 und 90 min

sowie Reperfusionzeiten von 30, 120 und 240 min gewählt. Die Auswahl der Ischämiezeiten erfolgte aufgrund bislang in der Literatur publizierte Studien über hepatische I/R an der Maus<sup>160, 188, 189</sup>. Da eine Ischämiedauer von 30-90 min als klinisch relevant beschrieben wurde, wählten die meisten Autoren dieses Zeitintervall zur Analyse der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation. Eine 90-minütige warme Ischämie stellt für die Maus den oberen Grenzwert für eine reversible Ischämie des linken Leberlappens dar<sup>189</sup>. Die 120-minütige warme Ischämie führt bereits zu Organschäden, auf deren Ausprägung eine Interaktion der Thrombozyten mit dem Endothel keinen zusätzlichen Einfluß hat<sup>189</sup>. Die Zerstörung des hepatischen Endothels nach 120 min warmer Ischämie macht es dabei unmöglich, die Rolle von endothelialen Adhäsionsmolekülen und intrazellulären Mechanismen zu untersuchen.

Unsere Ergebnisse demonstrieren, daß die Dauer der Ischämie die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion beeinflusst, während die Reperfusionsdauer zu den von uns untersuchten Zeiten keinen Einfluß hat. Eine Verlängerung der Reperfusionzeit läßt keine anderen Ergebnisse erwarten, da die Gesamtversuchsdauer die Möglichkeiten des gewählten experimentellen Settings mit Spontanatmung bei Inhalationsnarkose überschreiten würde und die Ausfallquote bei einer verlängerten Reperfusionzeit deutlich ansteigen würde.

### ***5.1.5. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie***

Die direkte Darstellung der Mikrozirkulation in verschiedenen Organen sowohl am Tier als auch am Menschen begann bereits in der Mitte des 17. Jahrhunderts. Die moderne, intravitale Videofluoreszenzmikroskopie erlaubt durch die Verwendung fluoreszierender

Farbstoffe die Visualisierung und quantitative Analyse lebender Zellen und ihrer dynamischen Wechselwirkungen in der Mikrozirkulation<sup>128</sup>. Sie ist in der Literatur als gut etabliertes Verfahren zur Charakterisierung physiologischer und pathophysiologischer Prozesse in unterschiedlichen Organen, (wie z.B. der Haut, dem quergestreiften Muskel<sup>135</sup>, der Lunge<sup>89</sup>, der Bauchspeicheldrüse<sup>66</sup>, der Leber<sup>120</sup>, dem Darm<sup>111</sup>, dem Gehirn<sup>6</sup> und der Synovia<sup>178</sup>) beschrieben. Unter der Verwendung spezieller Filtersätze im Mikroskop können mit unterschiedlichen Farbstoffen selektiv markierte Blutbestandteile (Zellen, Plasma) dargestellt werden. Die erforderliche chirurgische Präparation und die Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen stellen die häufigsten Probleme bei der intravitalen Mikroskopie dar. Ein möglicher phototoxischer Effekt wurde in unseren Versuchen durch kurze Beobachtungszeiträume und reduzierte Lichtenergie soweit wie möglich reduziert<sup>158, 170</sup>. Aus der Stabilität der Daten in der Kontrollgruppe läßt sich schließen, daß die von uns gewählten Farbstoffe und Präparations- bzw. Untersuchungstechniken nur einen zu vernachlässigenden Einfluß auf die Induktion des I/R- Schadens ausüben.

Sämtliche Analysen der mikrozirkulatorischen Parameter erfolgten *off-line*, wodurch der Beobachtungszeitraum des Versuches auf ein Minimum reduziert werden konnte. Durch den Einsatz einer computergestützten Bildanalyseeinheit, des *Computer assisted microcirculation analysis system CAMAS*<sup>®</sup>, zur Untersuchung der Mikrozirkulation wurden die Aufnahmen der Mikrozirkulation quantitativ ausgewertet. Dieses Verfahren ist in der Literatur gut etabliert<sup>7, 111, 136, 171</sup>.

Die Beteiligung von Thrombozyten an der I/R der Leber wurde bislang nur *ex vivo* anhand immunhistochemischer<sup>27, 189</sup> bzw. elektronenmikroskopischer<sup>28</sup> Untersuchungen demonstriert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Thrombozyten-Endothelzell-

Interaktion erstmals *in vivo* quantitativ nach hepatischer I/R analysiert. Des Weiteren konnten wir erstmals die intravaskuläre Lokalisation der postischämischen Thrombozytenadhärenz *in vivo* aufzeigen und zusätzlich mögliche zugrundeliegende Mechanismen beschreiben.

Die Adhärenz von Leukozyten am mikrovaskulären Endothel charakterisiert - neben sinusoidalen Perfusionsausfällen - den I/R-Schaden nach hepatischer Ischämie und wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben<sup>180-182</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in postsinusoidalen Venolen analysiert. Darüberhinaus sollte die simultane intravitalmikroskopische Darstellung der Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion die Untersuchung der differentiellen Rolle von Thrombozyten im Vergleich zu Leukozyten bei der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens erlauben.

Die sinusoidale Perfusionsrate stellt einen wichtigen funktionellen Parameter der hepatischen Mikrozirkulation dar<sup>69, 86</sup>. Die Plasmakontrastierung durch die Applikation von FITC-Dextran ermöglichte die Visualisierung der sinusoidalen Perfusion. Für die spätere Auswertung der sinusoidalen Perfusion wurden jeweils 7 Azini zum jeweiligen Meßzeitpunkt für 20 Sekunden aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte *off-line* an Videostandbildern.

Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit wurde in Arteriolen, Venolen und Sinusoiden bestimmt. Sie stellt einen physiologisch wie pathophysiologisch relevanten Parameter für die nutritive Perfusion von Geweben dar<sup>121</sup>. Da die Fließgeschwindigkeit die postischämische Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten mit dem hepatischen Endothel beeinflussen könnte, wurde sie in Arteriolen, Venolen und Sinusoiden in allen Versuchen mittels CAMAS<sup>®194</sup> im *frame-to-frame* Modus gemessen.

### **5.1.6. Parameter des hepatozellulären Schadens**

#### **5.1.6.1. Leberenzyme**

Die Analyse der Serumaktivitäten der Leberenzyme GOT und GPT diene zur Beurteilung der hepatozellulären Integrität. Da die Leberenzyme schon vor Auftreten von strukturellen Veränderungen erhöht sein können<sup>88</sup>, wurde die Kombination dieser beiden Enzyme ausgewählt, um einen besseren Überblick über die Entwicklung pathologischer Prozesse des Lebergewebes zu erhalten. Darüberhinaus wäre die Bestimmung der GOT alleine für die Analyse des Schadens nicht ausreichend repräsentativ, weil sie auch in Zellen anderer Gewebe (z.B. des Herzens<sup>187</sup>, des Darmes<sup>191</sup>) vorhanden ist. Im Gegensatz dazu wird die Erhöhung der Serum-GPT-Aktivität als sehr sensitiver und spezifischer Parameter für Leberschädigungen angesehen<sup>53</sup>; noch viel mehr scheint dies für die Kombination der Serumaktivitäten von GOT und GPT als Parameter für die Quantifizierung des Ausmaßes des hepatozellulären Schadens zu gelten<sup>23</sup>.

#### **5.1.6.2. Apoptosemarker**

Zusätzlich zum nekrotischen hepatischen I/R-Schaden<sup>58, 78</sup> wurde in kürzlich publizierten Studien die Apoptose als entscheidender zur Organdysfunktion nach kalter und warmer hepatischer Ischämie führender Mechanismus identifiziert<sup>84, 85, 131, 166, 190</sup>. Apoptose ist ein physiologisches, phylogenetisch hochkonserviertes Programm des regulierten Zelltodes, charakterisiert durch Kernschrumpfung mit DNA-Fragmentierung, Phospholipidveränderungen in der Zellmembran und Zellschrumpfung<sup>67</sup>. Dieser programmierte Zelltod kann durch zahlreiche Schädigungsmechanismen, wie z.B. radioaktive Strahlung oder Hitze, induziert werden. Für den I/R-Schaden konnte gezeigt

werden, daß freie O<sub>2</sub>-Radikale über die Aktivierung der Caspasen-Kaskade die Induktion von Apoptose auslösen können<sup>131</sup>.

Wir untersuchten das Ausmaß der Apoptose-Induktion nach hepatischer I/R mittels drei unterschiedlicher Methoden (Caspase-3-Aktivität, TUNEL-Färbung, und *in vivo* DNA-Färbung), welche verschiedenen Aspekte der Apoptose erfassen. Caspase-3 ist ein hochspezifischer intrazellulärer Mediator der Apoptose, der u.a. durch Hypoxie, reaktive Sauerstoffspezies oder inflammatorische Mediatoren initiiert wird<sup>82</sup>. Obwohl die TUNEL-Färbung ein unspezifisches Untersuchungsverfahren der Apoptose darstellt<sup>58</sup>, erlaubt diese Methode eine morphologische Differenzierung zwischen apoptotischen Hepatozyten und Endothelzellen<sup>190</sup>. Mittels der von *Westermann et al.* vorgeschlagenen *in vivo* Bisbenzamid-Färbung konnten sowohl die spezifischen intrazellulären Änderungen auf der DNA-Ebene (Kernkondensation, DNA-Fragmentation) visualisiert als auch die Lokalisation geschädigter Zellen (“extravaskulär” oder “intravaskulär”) dargestellt werden<sup>184</sup>.

## **5.2. Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1. Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber**

Die Leber ist ein stoffwechselaktives Organ, das mit einer Vielzahl an metabolisierenden Enzymen ausgestattet ist, die sowohl für den Substratabbau als auch die Proteinsynthese verantwortlich sind. Eine Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr, z.B. bei Ischämie, führt daher rasch zum Absinken der Konzentrationen energiereicher Phosphate in den Hepatozyten<sup>83</sup>. Daraus resultiert die Akkumulation von sauren Valenzen, die Aktivierung hypoxie-sensitiver Gene (z.B. HO-1, VEGF, EPO usw.), eine mitochondriale Dysfunktion und die Unterbrechung der Proteinsynthese<sup>22, 64</sup>. Darüberhinaus wird einer intrazellulären Aktivierung zelleigener lysosomaler Enzyme eine Bedeutung bei der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens zugeschrieben<sup>20, 36, 90, 163</sup>.

Das primäre Substrat des hepatischen I/R-Schadens stellt die Mikrozirkulation der Leber dar<sup>129</sup>. Intravitalmikroskopische Untersuchungen haben in den letzten Jahren wesentlich zur Charakterisierung des I/R-Schadens der Leber beigetragen. Er ist gekennzeichnet durch sinusoidales Perfusionsversagen (*“No-reflow”*), durch die Akkumulation von Leukozyten im Bereich der Sinusoide und postsinusoidalen Venolen (*“Reflow”*-Paradox) und durch eine Beeinträchtigung der hepatozellulären Funktion und Integrität<sup>122, 125</sup>.

#### **5.2.1.1. “No-reflow” in der Leber**

Die Mechanismen des postischämischen *“No-reflow”* in der Leber bestehen im Anschwellen der sinusoidalen Endothelzellen<sup>179</sup> und hämorheologischen Störungen<sup>119, 123</sup>. Wie im kapillaren Endstrombett führt auch in den Sinusoiden der Verlust energiereicher Phosphate in den stoffwechselaktiven sinusoidalen Endothelzellen rasch zum Sistieren der

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Pumpe. Dadurch verliert die Zelle die Fähigkeit, das komplexe Elektrolyt-Wasser-Gleichgewicht aufrecht zu erhalten, und freies Wasser strömt in die Zelle. Dies hat ein Anschwellen der Endothelzelle und damit eine Volumenzunahme zur Folge, die das Lumen der Sinusoide einengt. Mittels intravitalmikroskopischer Untersuchungen konnte demonstriert werden, daß der hepatische I/R-Schaden eine Beeinträchtigung der sinusoidalen Perfusion induziert<sup>24, 86, 179</sup>. Dabei ist das Ausmaß der Perfusionsstörungen nach hepatischer I/R abhängig von der Ischämiedauer<sup>181</sup>. An der Ratte hat sich gezeigt, daß bereits nach 60 min normothermer isolierter Ischämie des linken Leberlappens die oben beschriebenen Auswirkungen des hepatischen I/R-Schadens zu beobachten sind<sup>181</sup>.

#### **5.2.1.2. “Reflow”-Paradox in der Leber**

Während der Ischämie kommt es zusätzlich zur Akkumulation von Purinsäureabbauprodukten, die aufgrund des O<sub>2</sub>-Mangels nicht weiter verstoffwechselt werden können. Wird das Lebergewebe nach Wiederherstellung des hepatischen Blutflusses reoxygeniert, führt die Ansammlung von Substrat zur Aktivität der endothelialen Xanthinoxidase, wodurch freie O<sub>2</sub>-Radikale freigesetzt werden<sup>148, 149</sup>. Dadurch werden redox-sensitive Transkriptionsfaktoren aktiviert, die unter physiologischen Bedingungen in inaktiver Form in der Zelle vorliegen und unter Stress (reaktive Sauerstoffspezies, Chemokine, Zytokine) sehr rasch aktivierbar sind. In den vergangenen Jahren konnte die durch den Transkriptionsfaktor NF-κB vermittelte Signaltransduktionskaskade weiter aufgeklärt werden<sup>114</sup>. In der nicht-stimulierten Zelle bildet NF-κB Heteropolymere mit einer Klasse inhibitorischer Proteine, den sog. IκB. IκBs maskieren die *nuclear location site* von NF-κB und verhindern so die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern. Im Rahmen der Zellaktivierung kommt es zur



Phosphorylierung und anschließender Dissoziation und Degradation des I $\kappa$ B. I $\kappa$ B-Kinasen und Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinasen) scheinen eine entscheidende Rolle für die mit der Zellaktivierung verbundenen Phosphorylierungsprozesse zu spielen<sup>37, 114, 145, 164, 169, 193</sup>. Nach Abspaltung des I $\kappa$ B tritt NF- $\kappa$ B in den Zellkern über und induziert dort die Expression von Genen, die u.a. für Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1, MAdCAM-1, P-, E-Selektine) und proinflammatorische Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) kodieren<sup>114</sup>.

Adhäsionsmoleküle aus den Familien der Selektine<sup>74, 39, 104, 105, 188</sup> Integrine, und Immunglobulin-ähnlichen Proteine<sup>107, 180</sup> scheinen auch nach hepatischer I/R für die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion von Bedeutung zu sein. Aktivierte neutrophile Granulozyten bilden ihrerseits freie O<sub>2</sub>-Radikale und die so aktivierten Leukozyten interagieren weiter mit dem hepatischen Endothel. Als gesichert gilt, daß Leukozyten zunächst am aktivierten Endothel rollen, dann permanent adhären und letztendlich in das Lebergewebe transmigrieren<sup>15</sup>. Mittels Intravitalmikroskopie wurde gezeigt, daß Leukozyten sowohl in Sinusoiden<sup>182</sup> als auch in postsinusoidalen Venolen adhären<sup>2, 86, 147</sup>. Diese Leukozytenadhärenz in hepatischen Venolen und Sinusoiden beeinträchtigt die sinusoidale Perfusion zusätzlich. Die Bedeutung der Leukostase in den Sinusoiden für die Ausbildung des hepatischen "No-reflow" wird kontrovers diskutiert<sup>182</sup>. In histologischen Untersuchungen wurde demonstriert, daß Leukozyten nach ihrer Adhärenz das postischämische hepatische Gewebe massiv infiltrieren können. Aktivierte neutrophile Granulozyten bilden freie O<sub>2</sub>-Radikale und freisetzen nach ihrer Adhäsion am postischämischen Endothel und folgender Transmigration eine Reihe von proinflammatorischen Mediatoren, die den Ischämie-Reperfusionsschaden weiter verstärken können. Es wurde gezeigt, daß das Ausmaß der Infiltration mit einem Anstieg

von hepatischen Transaminasen und hepatozellulärer Nekrose korreliert<sup>77, 78</sup>. Neueste Befunde demonstrieren jedoch, daß durch die Gabe eines anti-ICAM-1-Antikörpers nach orthotoper Rattenlebertransplantation die postsinusoidale Leukozytenadhärenz zwar reduziert, die frühe Transplantatfunktion jedoch nicht verbessert wird<sup>150</sup>.

Daneben scheinen ortständige Zellen, wie die Kupfferzellen und die Itozellen, für die Induktion des I/R-Schadens von Bedeutung zu sein<sup>34, 69, 108, 183</sup>. Die Kupfferzellen werden nach 15 Minuten Reperfusion aktiviert<sup>18</sup> und produzieren dabei freie O<sub>2</sub>-Radikale sowie eine Vielzahl an Mediatoren, wie z.B. Eikosanoide, PAF, Hydrolase, Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 usw.), die zu einer weiteren leukozytären Aktivierung beitragen und damit an der Induktion des I/R-Schadens ursächlich beteiligt sein können<sup>33, 60, 133</sup>.

Zusätzlich zu den zellulären Komponenten des hepatischen I/R-Schadens vermittelt die Aktivierung der klassischen und alternativen Komplementkaskade die Bildung von *membrane attack complex*, welcher durch seine zytotoxische Wirkung zu weiteren Zellschäden führt<sup>21, 73, 81, 95, 152, 174</sup>. Des Weiteren verstärken die aktivierten Faktoren des Komplementsystems die Leukozytenaktivierung und -akkumulation sowie deren Interaktion mit Thrombozyten<sup>76, 79, 101, 151, 165</sup>.

In der aktuellen Literatur wird zunehmend diskutiert<sup>166, 167, 189</sup>, ob neben Leukozyten auch Thrombozyten eine pathophysiologische Rolle bei der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens einnehmen. Eine *in vivo* Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion während hepatischer I/R lag bislang jedoch nicht vor. Darüber hinaus ist nicht bekannt, welche differentielle Bedeutung den Thrombozyten gegenüber den Leukozyten bei der Ausbildung des hepatischen I/R-Schaden *in vivo* zukommt.

### ***5.2.2. Systematische Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in***

#### ***Abhängigkeit von Ischämie- und Reperfusionsdauer***

In der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen, die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der Leber nach I/R *in vivo* zu visualisieren und quantitativ zu analysieren. Es konnte gezeigt werden, daß Thrombozyten, im Gegensatz zu Leukozyten, eine Interaktion mit dem postischämischen Endothel nicht nur in Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen, sondern auch in präsinusoidalen Arteriolen eingehen. Verschiedene Faktoren werden für dieses unterschiedliche Verhalten von Leukozyten und Thrombozyten verantwortlich gemacht. Bei höheren Fließgeschwindigkeiten, wie sie in Arteriolen auftreten können, ist die Thrombozytenkonzentration im Randstrom höher als bei niedrigen Fließgeschwindigkeiten<sup>186</sup>. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Thrombozyt mit dem Endothel in Kontakt tritt, ist daher in Arteriolen höher. Zusätzlich unterscheiden sich Thrombozyten von Leukozyten u.a. durch ihren geringeren Durchmesser (Thrombozyten: 2-3 µm, Leukozyten: 8-12 µm). Geht man von einem laminaren Strömungsprofil aus, ist eine Zelle geringeren Durchmessers auch niedrigeren Scherkräften ausgesetzt als eine Zelle größeren Durchmessers<sup>177</sup>. Weiterhin unterscheiden sich die an der Interaktion von Leukozyten und Thrombozyten mit den Endothelzellen beteiligten molekularen Mechanismen. Darüberhinaus könnten Unterschiede hinsichtlich der Bindungsaffinitäten von Rezeptoren für ihre Liganden das unterschiedliche Verhalten von Leukozyten und Thrombozyten erklären. Es wird vermutet, daß sogar schwache Rezeptor-Ligand-Interaktionen zur Thrombozytenadhärenz in Arteriolen führen könnten<sup>111</sup>.

In Sinusoiden wurde nach 90 min Ischämie und 30 min Reperfusion ein signifikanter Anstieg der Anzahl adhärenter Thrombozyten registriert. Sowohl die quantitative Analyse der Thrombozytenadhärenz in Sinusoiden als auch ein möglicher Einfluß dieser

Interaktion auf den I/R-Schaden ist sehr umstritten, weil der postischämische Perfusionsausfall (bis zu 50% nicht-perfundierter Sinusoide) dazu führt, daß zirkulierende Thrombozyten in den nicht-perfundierten Sinusoiden mechanisch verbleiben ("stagnieren"). Mittels intravitalmikroskopischer Methoden ist es jedoch äußerst schwierig, die Thrombozyten, welche infolge einer aktiven Interaktion mit den sinusoidalen Endothelzellen adhären, von in nicht-perfundierten Sinusoiden ohne Interaktion mit Endothelzellen "stagnierenden" Thrombozyten zu unterscheiden. Des weiteren haben die Untersuchungen bezüglich der Leukozytenadhärenz in Sinusoiden demonstriert, daß die sinusoidale Leukostase *per se* eine geringe Bedeutung für den mikrovaskulären hepatischen I/R-Schaden hat<sup>182</sup>. Über die sinusoidale Thrombostase ist bekannt, daß "stagnierende" Thrombozyten in Sinusoiden den sinusoidale Perfusionsausfall nicht beeinflussen<sup>28, 87</sup>. Darüber hinaus ist zu vermuten, daß "stagnierende" Thrombozyten in Sinusoiden, im Gegensatz zu adhärenen Thrombozyten, nicht aktiviert sind und daher nicht zur Schadeninduktion beitragen können.

Intravitalmikroskopische Studien am postischämischen Darm haben gezeigt, daß eine 90-minütige Ischämie<sup>112</sup> einen Anstieg der Anzahl adhärenter Thrombozyten im Vergleich zu einer 60-minütigen Ischämie<sup>111</sup> induziert. In der Leber wurde die Abhängigkeit der Thrombozytenadhäsion von der Ischämiedauer bislang nur in *ex vivo* Untersuchungen demonstriert. An der isoliert-perfundierten Rattenleber konnte gezeigt werden, daß die Anzahl im System zirkulierender Thrombozyten mit einer Verlängerung der Ischämiezeit von 15 bis 30 bzw. 60 min signifikant reduziert wurde<sup>28</sup>. Die vorliegende Arbeit stellt die erste quantitative Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion während hepatischer I/R *in vivo* dar und demonstriert, daß das Ausmaß sowohl des Thrombozytenrollens als auch der Thrombozytenadhärenz in hepatischen präsinusoidalen

Arteriolen, postsinusoidalen Venolen und Sinusoiden von der Ischämiezeit abhängig ist. Obwohl aufgrund unserer Ergebnisse die Mechanismen der Abhängigkeit der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion von der Ischämiezeit nicht erklärt werden können, zeigen Daten aus der Literatur einen Einfluß der Ischämiezeit auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies<sup>75</sup>, die sowohl an der Thrombozytenaktivierung und als auch an der Expression von Adhäsionsmolekülen beteiligt sind.

Im Gegensatz zu dem signifikanten Einfluß der Ischämiedauer fanden sich zwischen den unterschiedlichen Reperfusionzeiten bei identischen Ischämieintervallen keine Unterschiede in der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion. Daraus folgt, daß die Reperfusionsdauer in den ersten 4 Stunden keinen Einfluß auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion hat. Während bislang keine systematische Untersuchung bezüglich der Bedeutung des Reperusionsintervalles für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der Leber vorlag, demonstrieren sowohl die eigenen Daten als auch die Angaben in der Literatur<sup>8</sup>, daß eine Verlängerung der Reperusionszeit bis auf 240 min auch auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion keinen Einfluß hat.

Der erste Teil dieser Arbeit läßt sich daher wie folgt zusammenfassen: 1) Warme hepatische I/R induziert Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in präsinusoidalen Arteriolen, Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen; 2) Das Ausmaß dieser Interaktion ist von der Ischämiezeit abhängig, während die Dauer der Reperfusion keinen Einfluß hat.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die nachfolgenden Experimente zu den Mechanismen der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion anhand eines Versuchsprotokolls von 90 min Ischämie und 30 min Reperfusion durchgeführt.

### **5.2.3. Die Bedeutung von P-Selektin für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion**

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle von P-Selektin für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion und den mikrovaskulären I/R-Schaden der Leber mittels IVM analysiert. Erste Hinweise für die Bedeutung von P-Selektin für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der Leber wurden durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe von *Clavien et al.* gegeben<sup>189</sup>. Dabei haben immunhistochemische Analysen gezeigt, daß die Anzahl CD9-markierter thrombozytärer Aggregate in der postischämischen Leber von P-Selektin-defizienten Mäuse reduziert ist<sup>189</sup>. CD9-Rezeptoren sind jedoch nicht nur auf Thrombozyten, sondern auch auf aktivierten Lymphozyten, Eosinophilen, Granulozyten und Monozyten exprimiert<sup>5</sup>. Darüberhinaus ist die Immunfärbung nicht in der Lage, die am Endothel adhärenen Thrombozyten von in Sinusoiden “stagnierenden” Thrombozyten zu unterscheiden.

Unsere Ergebnisse demonstrieren, daß endotheliales P-Selektin eine entscheidende Rolle für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in präsinusoidalen Arteriolen und postsinusoidalen Venolen nach hepatischer I/R spielt. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten der Literatur überein, die anhand von Untersuchungen der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion am postischämischen Darm der Maus eine vergleichbare Bedeutung des endothelialen P-Selektins gezeigt haben<sup>111</sup>.

In Sinusoiden war die postischämische Thrombozytenadhäsion von der P-Selektin-Expression unabhängig. Da P-Selektin die initiale Interaktion der Thrombozyten (=Thrombozytenrollen) mit dem Endothel mediiert, welche in unser Studie in Sinusoiden nicht beobachtet wurde, scheint die Thrombozytenadhäsion in Sinusoiden durch andere Adhäsionsmoleküle vermittelt zu werden. Außerdem könnte die sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der Literatur beschriebene geringe

Blutfließgeschwindigkeit in Sinusoiden<sup>120</sup> bewirken, daß Thrombozyten eine permanente Interaktion mit dem sinusoidalen Endothel direkt über andere Mechanismen (z.B. GPIIb/IIIa-Fibrinogen-ICAM-1-Interaktion) eingehen. Unsere Ergebnisse sprechen für eine entscheidende Bedeutung von P-Selektin für die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in hepatischen Arteriolen und Venolen. Diese Befunde werden dadurch unterstützt, daß P-Selektin auf dem Endothel präsinusoidaler Arteriolen und postsinusoidaler Venolen, nicht hingegen in Sinusoiden der Mäuseleber<sup>40</sup> exprimiert wird. Offensichtlich spielt das thrombozytäre P-Selektin nur eine untergeordnete Rolle bei der I/R-induzierten Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion, ist jedoch an der Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion beteiligt<sup>16, 35, 43, 92, 192</sup>.

Bislang ist jedoch unklar, welcher Ligand die Interaktion zwischen endothelialelem P-Selektin und Thrombozyten mediiert. Eine mögliche Bedeutung kommt PSGL-1 zu, der an der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion *in vitro* und *in vivo* beteiligt ist<sup>10, 130, 137, 185</sup> und, wie kürzlich demonstriert wurde, auch auf der Thrombozytenmembran exprimiert wird<sup>44</sup>.

In unseren Untersuchungen wurde gezeigt, daß P-Selektin auch eine entscheidende Rolle bei der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion spielt. Unsere Daten stimmen mit Daten aus der Literatur überein, die eine Reduktion der Anzahl rollender und adhärenter Leukozyten in P-Selektin-defizienten Tieren sowohl nach hepatischer I/R als auch in der Leber nach hämorrhagischem Schock beschrieben haben<sup>160, 161, 168</sup>.

Wie bereits am Herzen<sup>94</sup>, der Lunge<sup>176</sup> und am Darm<sup>29, 111</sup> gezeigt wurde, hat die Blockade von P-Selektin einen positiven Effekt auf den I/R-Schaden. In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, daß bei Fehlen einer P-Selektin-vermittelten Zell-Zell-Interaktion der mikrovaskuläre hepatische I/R-Schaden und die Induktion von Apoptose

signifikant vermindert waren. Die sinusoidale Perfusion stellt einen etablierten Parameter dar, welcher die Ausbildung des mikrovaskulären I/R-Schadens in der Leber charakterisiert<sup>86</sup>. In unseren Experimenten wiesen P-Selektin-defiziente Tiere sowohl eine signifikant verbesserte sinusoidale Perfusion als auch reduzierte GOT/GPT-Aktivitäten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nach I/R auf. Während eine Reduktion der Enzymaktivitäten sowohl nach P-Selektin-Blockade<sup>39, 168</sup> als auch in P-Selektin-defizienten Mäusen<sup>189</sup> nach I/R der Leber beschrieben wurde, zeigen unsere Daten klar, daß die Verminderung der Enzymaktivitäten mit einer Verbesserung der sinusoidalen Perfusion und einer Reduktion der Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion assoziiert war.

Obwohl Nekrose als Resultat hepatischer I/R beschrieben wurde<sup>78, 195</sup>, demonstrieren jüngste Veröffentlichungen eine Induktion von Apoptose in der Leber nach kalter<sup>47</sup> und warmer<sup>84</sup> Ischämie. Während ein protektiver Effekt der P-Selektin-Hemmung auf die Apoptoseinduktion am postischämischen Gehirn<sup>175</sup> und im Herzen<sup>80</sup> bereits bekannt ist, lag bislang jedoch keine Studie vor, in welcher die Bedeutung P-Selektin-mediierter Zell-Zell-Interaktion für die Ausbildung der Apoptose in der postischämischen Leber gezeigt wurde. Wir beobachteten eine Reduktion der Caspase-3-Aktivität, der Anzahl TUNEL-positiver Hepatozyten und der Anzahl von Zellen mit Kernkondensation im postischämischen Lebergewebe P-Selektin-defizienter Tiere. Damit wird in der vorgelegten Arbeit erstmals ein protektiver Effekt der P-Selektin-Hemmung für die Apoptoseinduktion *in vivo* demonstriert.

Aus diesen Befunden lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen: 1) P-Selektin, welches auf Endothelzellen in präsinusoidalen Arteriolen und postsinusoidalen Venolen exprimiert ist, spielt in der Leber eine entscheidende Rolle für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion. 2) Die Reduktion der Thrombozyten- und Leukozyten-



Endothelzell-Interaktion in P-Selektin-defizienten Tieren geht mit einer signifikanten Verringerung des mikrovaskulären Schadens und einer verminderten Apoptose-Induktion nach hepatischer I/R einher.

#### ***5.2.4. Einfluß der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion auf den hepatischen I/R-Schaden.***

Um die differentielle Bedeutung von Thrombozyten im Vergleich zu Leukozyten bei der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens untersuchen zu können, wurde ein Versuchsansatz gewählt, in welchem sich die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion selektiv unterbinden läßt, ohne die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zu beeinflussen.

Die Endothelzelloberfläche ist unter physiologischen Bedingungen nicht thrombogen, d.h. Thrombozyten werden nicht aktiviert und zur Adhäsion angeregt. Nach I/R wird das physiologische Gleichgewicht zwischen pro- und antikoagulativen Komponenten dahingehend gestört, daß die Aktivität von Thrombomodulin reduziert und damit Thrombin aktiviert wird. Dieses spaltet das intravasal ubiquitär vorkommende Fibrinogen in Fibrin-Spaltprodukte, welche sich aneinander anlagern und damit einen der Initialfaktoren der Gerinnungskaskade darstellen. Wie jüngste Veröffentlichungen beschrieben haben<sup>112</sup>, wird die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion am postischämischen Endothel über Fibrinogen mediiert, welches an das von Endothelzellen konstitutiv exprimierte ICAM-1 bindet. Am Modell der I/R am Mäusedarm konnte klar gezeigt werden, daß eine Blockade dieses Mechanismus in einer signifikanten Reduktion der Anzahl am postischämischen Endothel permanent adhärenter Thrombozyten resultiert<sup>112</sup>. Ausgehend von diesen Kenntnissen beabsichtigten wir die folgenden Fragen

zu beantworten: 1) Spielt Fibrinogen bei der postischämischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in hepatischen Mikrogefäßen eine Rolle? 2) Hat die Fibrinogen-Blockade auch einen Einfluß auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion? 3) Falls unsere Hypothese bestätigt wäre und der Fibrinogen-Antikörper selektiv die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion blockieren würde, inwiefern sind Parameter des hepatischen I/R-Schadens von diesem Effekt beeinflusst?

Nachdem eine Fibrin(ogen)akkumulation am postischämischen Endothel bereits an Herz<sup>132</sup>, Niere<sup>38</sup>, Gehirn<sup>139</sup> und Darm<sup>112</sup> nachgewiesen wurde, zeigt die vorliegende Arbeit, daß auch in hepatischen Mikrogefäßen eine massive Fibrin(ogen)akkumulation nach warmer Ischämie stattfindet. Darüberhinaus konnten wir demonstrieren, daß die Applikation eines Antifibrinogen-Antikörpers kurz vor Beginn der Reperfusion die Anzahl am postischämischen hepatischen Endothel adhärenter Thrombozyten in präsinusoidalen Arteriolen, Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen signifikant reduziert.

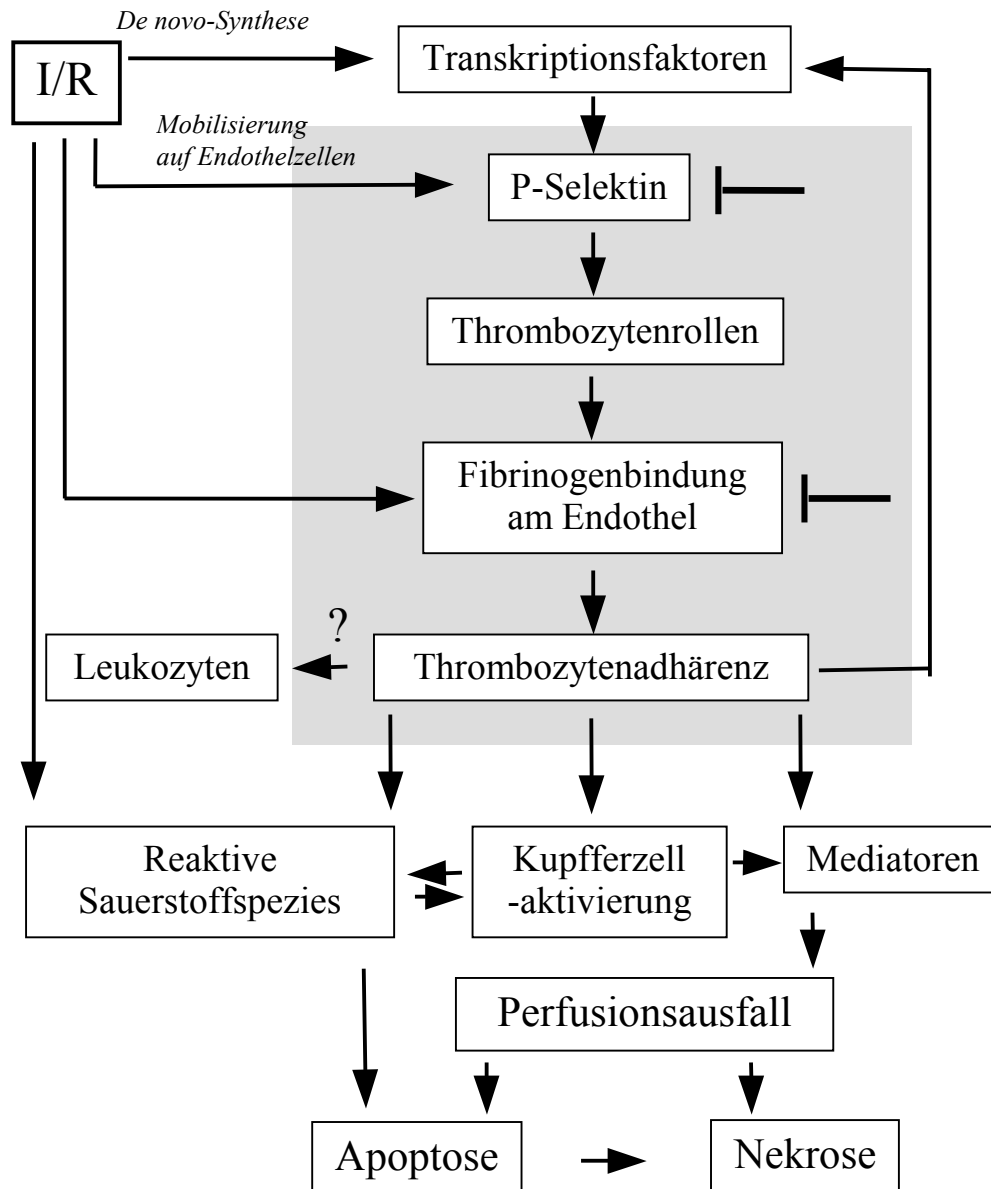
Wie in 5.2.3. beschrieben wurde, mediiert P-Selektin die initiale Interaktion von Leukozyten mit dem hepatischen Endothel und stellt damit die Voraussetzung für die permanente Adhärenz dar. Diese permanente Leukozytenadhärenz wird vornehmlich durch die Interaktion zwischen  $\beta$ 2-Integrinen auf der Leukozytenoberfläche und ICAM-1 auf dem Endothel vermittelt<sup>134</sup>. Allerdings gibt es in der Literatur auch Hinweise darauf, daß Fibrinogen die Adhäsion von Leukozyten an *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) *in vitro* vermitteln kann<sup>93</sup>. Die vorliegenden *in vivo*-Befunde zeigen jedoch, daß die Fibrinogen-Blockade keinen signifikanten Einfluß auf die Anzahl adhärenter Leukozyten nach I/R der Leber hat. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß Fibrin(ogen) eine entscheidende Rolle für die permanente Adhäsion von Thrombozyten nach I/R in

hepatischen Mikrogefäßen spielt, an der postischämischen Leukozytenadhärenz jedoch nicht beteiligt ist.

Zugleich mit der Reduktion der Thrombozytenadhäsion in hepatischen Mikrogefäßen war der postischämische Anstieg der Leberenzym- und Caspase-3-Aktivitäten sowie der Anzahl TUNEL-positiver Hepatozyten signifikant vermindert. Darüberhinaus zeigen die vorliegenden *in vivo*-Daten, daß die Hemmung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion mit einer Verminderung sowohl des mikrovaskulären bzw. hepatozellulären I/R-Schadens als der Apoptose-Induktion einhergeht. Der zugrundeliegende Mechanismus der Mediiierung des I/R-Schadens der Leber durch die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion ist nicht eindeutig geklärt und wird in der aktuellen Literatur kontrovers diskutiert (siehe Abb. 24)<sup>28, 49, 50, 125, 166, 167</sup>. Aktivierte Thrombozyten sind in der Lage, sowohl Sauerstoff- und Stickstoffradikale zu produzieren als auch potente proinflammatorische Mediatoren freizusetzen, die ihrerseits eine chemotaktische Wirkung besitzen<sup>32, 142</sup>. Diese unterschiedlichen pathophysiologischen Vorgänge resultieren in einem sich selbst verstärkenden *Circulus vitiosus*. Chemokine und Zytokine modulieren einen Anstieg der mikrovaskulären Permeabilität, der von der Entstehung eines interstitiellen Ödems und einer Zunahme des interstitiellen Drucks gefolgt ist<sup>118</sup>. Dadurch kann es zu intravaskulärer Hämokonzentration und zusätzlicher Beeinträchtigung der sinusoidalen Perfusion und damit zum Verlust der Zellintegrität und einer Verstärkung des postischämischen Parenchymzellschadens und Apoptose während Reperfusion kommen<sup>179</sup>. Darüber hinaus zeigt eine kürzlich publizierte Studie, daß am postischämischen Endothel adhärente Thrombozyten Kupfferzellen aktivieren können, die ihrerseits an der Apoptose-Induktion in der kalt-perfundierten Leber beteiligt sind<sup>167</sup>. Schließlich wurde demonstriert, daß am Endothel adhärente und aktivierte Thrombozyten

in der Lage sind, intrazelluläre Transkriptionsfaktoren zu aktivieren (z.B. NF- $\kappa$ B und AP-1), welche die Expression von an der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beteiligten Adhäsionsmolekülen<sup>49, 50</sup> und proinflammatorischen Mediatoren induzieren<sup>144</sup> und damit den I/R-Schaden der Leber weiter verstärken. In der vorliegenden Arbeit hatte die Hemmung der Thrombozytenadhäsion während der frühen Reperfusionphase jedoch keinen Einfluß auf die Leukozytenadhäsion, wohl deswegen, weil eine Thrombozyten-induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen nur nach 4-5 Stunden Reperfusion stattfinden könnte<sup>106</sup>.

Der dritte Teil dieser Arbeit läßt sich daher wie folgt zusammenfassen: 1) Fibrinogen mediiert die Thrombozytenadhärenz in Arteriolen und Venolen nach I/R der Leber, ist jedoch an der postischämischen Leukozytenadhärenz nicht beteiligt; 2) Die selektive Reduktion der Thrombozytenadhärenz nach der Fibrinogen-Blockade geht bei unveränderter Leukozytenadhärenz mit einer Verminderung des mikrovaskulären und hepatozellulären I/R-Schadens einher. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß den Thrombozyten bei der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens eine größere Bedeutung zukommt, als dies bisher angenommen wurde.



**Abb. 24.** Konzept zur Rolle der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion bei der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens. Das Schema beinhaltet sowohl die in der vorliegenden Arbeit analysierten Mechanismen der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der Mikrozirkulation der postischämischen Leber (Schattierung) als auch die gegen die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion gerichteten Interventionen, die in der Lage waren, den hepatischen I/R-Schaden zu vermindern (⊥-Zeichen).

## 6. SCHLUSSFOLGERUNG

Der hepatische I/R ist die häufigste Ursache der postischämischen Organdysfunktion nach Lebertransplantation und -resektion. Die Rolle von Thrombozyten bei der Ausbildung des postischämischen Perfusionsversagens wird in der aktuellen Literatur kontrovers diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion während I/R der Leber erstmals systematisch *in vivo* analysiert. Die Ergebnisse zeigen, daß die initiale Interaktion von Thrombozyten mit dem hepatischen Endothel durch endotheliales P-Selektin mediiert wird. Darüber hinaus wird die permanente Thrombozytenadhäsion über Fibrin(ogen)bindung am Endothel hepatischer Mikrogefäße vermittelt. Eine selektive Blockade der Thrombozytenadhäsion reduziert sowohl den mikrovaskulären I/R-Schaden als auch die Apoptose-Induktion. Diese *in vivo*-Befunde deuten darauf hin, daß Thrombozyten einen wichtigen Faktor bei der Ausbildung des I/R-Schadens der Leber darstellen (Abb. 24).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit waren Ausgangspunkt für derzeit am Institut für Chirurgische Forschung laufende Studien. In unterschiedlichen experimentellen Ansätzen werden hierbei weiterführende Untersuchungen zur differentiellen Bedeutung von Leukozyten *versus* Thrombozyten bei der Ausbildung des I/R-Schadens und zur Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion bei hepatischer I/R durchgeführt.

Auf der Basis der hier erhobenen Befunde können einige der in der Literatur publizierten Studien zur Prävention des I/R-Schadens aus einem anderen Blickwinkel interpretiert werden. So wird z.B. der protektive Effekt von ischämischer bzw. pharmakologischer Präkonditionierung in Zusammenhang mit einer Reduktion der Expression von P-Selektin und damit einer Verminderung der postischämischen Leukozytenakkumulation gebracht<sup>30</sup>,

<sup>71, 72</sup>. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde lassen jedoch vermuten, daß der protektive Einfluß bestimmter Präkonditionierungsmaßnahmen zumindest partiell über eine Reduktion der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion vermittelt wird. Darüber hinaus werden in der klinischen Kardiologie bereits etablierte Fibrinogenrezeptor-antagonisten (z.B. Tirofiban, Integrelin, Abciximab) bei koronarer Intervention erfolgreich eingesetzt<sup>48</sup>. Inwiefern die präventive/therapeutische Beeinflussung der postischämischen Thrombozytenadhäsion eine Anwendung in der klinischen Routine nach Lebertransplantation oder -resektion bekommen könnte, muß durch weitere experimentelle und klinische Studien geklärt werden.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Der hepatische Ischämie-Reperfusionsschaden stellt ein relevantes klinisches Problem nach Lebertransplantation und Leberteilresektion sowie nach hämorrhagischem Schock dar. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, daß Thrombozyten an der Ausbildung des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens beteiligt sind. Bislang liegt jedoch keine Studie vor, in welcher die Mechanismen der Interaktion von Thrombozyten mit dem postischämischen hepatischen Endothel *in vivo* analysiert wurden. Insbesondere ist nicht geklärt, inwiefern diese Interaktion die Induktion und den Schweregrad des hepatozellulären Schadens beeinflusst.

Ziele der Studie waren daher (1) die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach hepatischer I/R mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie systematisch in Abhängigkeit von der Ischämie- und Reperusionszeit quantitativ zu analysieren, (2) zu untersuchen, welche Mechanismen die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der Leber vermitteln und (3) zu analysieren, welchen Einfluß diese Interaktion auf den Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber hat.

An einem etablierten murinen Modell der warmen hepatischen Ischämie-Reperfusion wurde die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion mittels intravitaler Videofluoreszenzmikroskopie untersucht. Thrombozyten wurden von separaten syngeneten Spendertieren isoliert, *ex vivo* mit Rhodamin-6G markiert, intravenös zu den jeweiligen Reperusionszeitpunkten appliziert und bezüglich ihrer Interaktion mit dem Endothel der hepatischen Mikrogefäße quantitativ analysiert. Zur begleitenden Analyse des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens wurden die sinusoidale Perfusionsrate, die Aktivität der Leberenzyme GOT/GPT im Serum und die Apoptosemarker Caspase-3-Aktivität und Anzahl TUNEL-positiver Zellen im Lebergewebe bestimmt. Durch



Verwendung P-Selektin-defizienter Tiere (sowohl Thrombozytenspender als auch Thrombozytenempfänger) wurde die Rolle von endothelialelem vs. thrombozytärem P-Selektin für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion untersucht. Des Weiteren wurde versucht, durch Applikation eines Fibrinogen-Antikörpers die differentielle Bedeutung von Thrombozyten im Vergleich zu Leukozyten an der Ausbildung des Organschadens der Leber nach I/R *in vivo* aufzuklären.

Es konnte gezeigt werden, daß hepatische Ischämie-Reperfusion eine Interaktion von Thrombozyten mit dem Endothel in präsinusoidalen Arteriolen, Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen induzierte. Das Ausmaß dieser Interaktion war von der Ischämiedauer abhängig, während hingegen die Reperfusionsdauer keinen wesentlichen Einfluß hatte. Die vermehrte Thrombozytenadhäsion ging mit einem signifikanten Anstieg des mikrovaskulären und zellulären Organschadens einher.

Untersuchungen an P-Selektin-defizienten Tieren demonstrierten, daß das endotheliale und nicht das thrombozytäre P-Selektin die Rollen und die nachfolgende Adhärenz von Thrombozyten in Arteriolen und Venolen der Leber vermittelte. Darüberhinaus war der postischämische Organschaden in P-Selektin-defizienten Tieren signifikant reduziert.

Mittels der Blockade von Fibrinogen während der Reperfusionsphase konnte gezeigt werden, daß Fibrin(ogen) die postischämische Thrombozytenadhäsion vermittelte, an der Leukozytenadhärenz jedoch nicht beteiligt war. Die selektive Hemmung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion führte zu einer signifikanten Reduktion des mikrovaskulären Schadens sowie der Apoptoseinduktion in der Leber nach Ischämie-Reperfusion. Somit demonstriert diese Studie erstmals *in vivo*, daß den Thrombozyten bei der Ausbildung des hepatischen I/R-Schadens eine wichtige Bedeutung zukommt.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Andreen M, Brandt R, Strandell T, Vinnars E, Zetterstrom BE. Hepatic gluconeogenesis during halothane anaesthesia in man. *Acta Anaesthesiol Scand* 1981; 25:453-460.
2. Anthuber M, Farkas S, Rihl M, Menger MD, Schildberg FW, Jauch KW, Messmer K. Impact of enalapril on microvascular perfusion and leukocyte adherence in a model of rat liver transplantation assessed by in vivo microscopy. *Transpl Int* 1996; 9 Suppl 1:S93-S96.
3. Authi KS. Ca<sup>2+</sup> homeostasis and intracellular pools in human platelets. *Adv Exp Med Biol* 1993; 344:83-104.
4. Badimon L, Steele P, Badimon JJ, Bowie EJ, Fuster V. Aortic atherosclerosis in pigs with heterozygous von Willebrand disease. Comparison with homozygous von Willebrand and normal pigs. *Arteriosclerosis* 1985; 5:366-370.
5. Barclay AN, Brown MH, Law SKA, McKnight AJ, Tomlinson MG, van der Merwe PA. *The leucocyte adhesion FactsBook*. San Diego, London, Boston, New York: Academic Press Harcourt Brace & Company, 1997:1-614.
6. Beck J, Stummer W, Lehmborg J, Baethmann A, Uhl E. Leukocyte-endothelium interactions in global cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1997; 70:53-55.
7. Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Langer S, Leiderer R, Krombach F, Messmer K. Ischemia at 4°C: a novel mouse model to investigate the effect of hypothermia on postischemic hepatic microcirculatory injury. *Res Exp Med (Berl)* 2001; 200:93-105.

8. Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, Messmer K, Krombach F. The influence of organ temperature on hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2001(in press).
9. Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol* 2000; 32:508-515.
10. Borges E, Eytner R, Moll T, Steegmaier M, Campbell MA, Ley K, Mossmann H, Vestweber D. The P-selectin glycoprotein ligand-1 is important for recruitment of neutrophils into inflamed mouse peritoneum. *Blood* 1997; 90:1934-1942.
11. Boros M, Massberg S, Baranyi L, Okada H, Messmer K. Endothelin 1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine. *Gastroenterology* 1998; 114:103-114.
12. Brown MF, Zibari G, Burney D, Granger DN, McDonald JC. Hepatic ischemia/reperfusion affects leukocyte rolling and velocity. *Clin Transplant* 1997; 11:511-515.
13. Bubel S, Wilhelm D, Entelmann M, Kirchner H, Kluter H. Chemokines in stored platelet concentrates. *Transfusion* 1996; 36:445-449.
14. Bullard DC, Qin L, Lorenzo I, Quinlin WM, Doyle NA, Bosse R, Vestweber D, Doerschuk CM, Beaudet AL. P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli. *J Clin Invest* 1995; 95:1782-1788.
15. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; 67:1033-1036.

16. Buttrum SM, Hatton R, Nash GB. Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood* 1993; 82:1165-1174.
17. Bzeizi KI. Primary graft dysfunction after liver transplantation: from pathogenesis to prevention. *Liver Transpl Surg* 1997; 3:137-148.
18. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 1991; 13:83-95.
19. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84:2068-2101.
20. Carlson RP, Lefer AM. Hepatic cell integrity in hypodynamic states. *Am J Physiol* 1976; 231:1408-1414.
21. Chavez-Cartaya R, Cozzi E, Pino-DeSola G, Jamieson NV, White DJ. Regulation of complement activation in rat liver ischemia and reperfusion: expression of endothelial CD59 (RIP). *Transplant Proc* 1995; 27:2852-2854.
22. Chen HM, Chen JC, Shyr MH, Chen MF, Hwang TL, Fan LL, Chi TY, Chi CP. Neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) attenuates reperfusion-induced hepatic microcirculatory derangement, energy depletion and lipid peroxidation in rats. *Shock* 1999; 12:462-467.
23. Clary JJ, Groth DH, Stokinger HE. Comparative changes in serum enzyme levels in beryllium- or carbon tetrachloride-induced liver necrosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; 143:1207-1210.
24. Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, Bauer I, Zhang JX. Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock* 1997; 8:80-85.

25. Cohen B. Increasing differences in number of organ transplantants between eurotransplantant countries. *Eurotransplantat Newsletter* 2000; 2-4.
26. Corso CO, Okamoto S, Rüttinger D, Messmer K. Hypertonic saline dextran attenuates leukocyte accumulation in the liver after hemorrhagic shock and resuscitation. *J Trauma* 1999; 46:417-423.
27. Cywes R, Mullen JB, Stratis MA, Greig PD, Levy GA, Harvey PR, Strasberg SM. Prediction of the outcome of transplantation in man by platelet adherence in donor liver allografts. Evidence of the importance of prepreservation injury. *Transplantation* 1993; 56:316-323.
28. Cywes R, Packham MA, Tietze L, Sanabria JR, Harvey PR, Phillips MJ, Strasberg SM. Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology* 1993; 18:635-647.
29. Davenpeck KL, Gauthier TW, Albertine KH, Lefer AM. Role of P-selectin in microvascular leukocyte-endothelial interaction in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1994; 267:H622-H630
30. Davis JM, Gute DC, Jones S, Krsmanovic A, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning prevents postischemic P-selectin expression in the rat small intestine. *Am J Physiol* 1999; 277:H2476-H2481
31. de Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V. Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction. *Haemostasis* 1999; 29:41-49.
32. de Gaetano G, Cerletti C, Nanni-Costa MP, Poggi A. The blood platelet as an inflammatory cell. *Eur Respir J Suppl* 1989; 6:441s-445.
33. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990; 192:245-261.

34. Dehmlow C, Erhard J, de Groot H. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology* 1996; 23:749-754.
35. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood* 1996; 88:146-157.
36. Dickens BF, Mak IT, Weglicki WB. Lysosomal lipolytic enzymes, lipid peroxidation, and injury. *Mol Cell Biochem* 1988; 82:119-123.
37. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 1997; 388:548-554.
38. Druid H, Rammer L. Protective effect on postischemic renal edema by anticoagulation. *Nephron* 1992; 60:319-323.
39. Dulkanchainun TS, Goss JA, Imagawa DK, Shaw GD, Anselmo DM, Kaldas F, Wang T, Zhao D, Busuttil AA, Kato H, Murray NG, Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. Reduction of hepatic ischemia/reperfusion injury by a soluble P-selectin glycoprotein ligand-1. *Ann Surg* 1998; 227:832-840.
40. Essani NA, Fisher MA, Simmons CA, Hoover JL, Farhood A, Jaeschke H. Increased P-selectin gene expression in the liver vasculature and its role in the pathophysiology of neutrophil-induced liver injury in murine endotoxin shock. *J Leukoc Biol* 1998; 63:288-296.
41. Faint RW. Platelet-neutrophil interactions: their significance. *Blood Rev* 1992; 6:83-91.

42. Flores NA, Goulielmos NV, Seghatchian MJ, Sheridan DJ. Myocardial ischaemia induces platelet activation with adverse electrophysiological and arrhythmogenic effects. *Cardiovasc Res* 1994; 28:1662-1671.
43. Forde RC, Fitzgerald DJ. Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury. *Circulation* 1997; 95:787-789.
44. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 2000;191:1413-1422.
45. Furie B, Furie BC. Leukocyte crosstalk at the vascular wall. *Thromb Haemost* 1997; 78:306-309.
46. Gaehtgens P. Microvascular flow disturbances: rheological aspects. In: *Microcirculation in circulatory disorders*. Eds.: Manabe H, Zweifach BW, Messmer K. Tokyo: Springer Verlag, 1988:11-19.
47. Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27:1652-1660.
48. Gawaz M. *Blutplättchen*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1999:1-146.
49. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schömig A, Neumann F. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 2000; 148:75-85.

50. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998; 98:1164-1171.
51. Gelman SI. Disturbances in hepatic blood flow during anesthesia and surgery. *Arch Surg* 1976; 111:881-883.
52. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990; 343:757-760.
53. Ghys A, Thys O, Hildebrand J, Georges A. Relation between hepatic and renal function tests and ultrastructural changes induced by 2-N-methylpiperazinomethyl-1,3-diazafluoranthren 1-oxide (AC-3579), a new experimental antileukemic drug. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975; 31:13-20.
54. Golino P, Ambrosio G, Ragni M, Pascucci I, Triggiani M, Oriente A, McNatt J, Buja LM, Condorelli M, Chiariello M. Short-term and long-term role of platelet activating factor as a mediator of in vivo platelet aggregation. *Circulation* 1993; 88:1205-1214.
55. Golino P, Ashton JH, Buja LM, Rosolowsky M, Taylor AL, McNatt J, Campbell WB, Willerson JT. Local platelet activation causes vasoconstriction of large epicardial canine coronary arteries in vivo. Thromboxane A2 and serotonin are possible mediators. *Circulation* 1989; 79:154-166.
56. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255:H1269-H1275
57. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails



to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995; 21:1465-1468.

58. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: Apoptosis or necrosis? *Hepatology* 2001; 33:397-405.
59. Gullo A, Berlot G. Ingredients of organ dysfunction or failure. *World J Surg* 1996; 20:430-436.
60. Hagmann W, Kaiser I, Jakschik BA. The sensitized liver represents a rich source of endogenous leukotrienes. *Hepatology* 1991; 13:482-488.
61. Hamano K, Tsuboi H, Seyama A, Esato K. Shock-reinfusion injury to the central organs and the effect of free radical scavengers in the rat. *Surg Today* 1993; 23:891-896.
62. Harris AG, Leiderer R, Peer F, Messmer K. Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia. *Am J Physiol* 1996; 271:H2388-H2398
63. Harris AG, Steinbauer M, Leiderer R, Messmer K. Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia- reperfusion injury. *Am J Physiol* 1997; 273:H989-H996
64. Hasselgren PO, Hellman A, Jennische E, Nordstrom G. Failure of an increased dose of ATP-MgCl<sub>2</sub> to improve protein synthesis and transmembrane potential in the postischemic liver. *J Surg Res* 1984; 37:409-414.
65. Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan JM, Granger DN. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 1987; 253:H699-H703

66. Hoffmann TF, Leiderer R, Harris AG, Messmer K. Ischemia and reperfusion in pancreas. *Microsc Res Tech* 1997; 37:557-571.
67. Holtz J, Heinrich H. Apoptosis--what is it? Significance in coronary heart disease and myocardial infarct. *Herz* 1999; 24:196-210.
68. Horie Y, Wolf R, Anderson DC, Granger DN. Nitric oxide modulates gut ischemia-reperfusion-induced P-selectin expression in murine liver. *Am J Physiol* 1998; 275:H520-H526
69. Horie Y, Wolf R, Russell J, Shanley TP, Granger DN. Role of Kupffer cells in gut ischemia/reperfusion-induced hepatic microvascular dysfunction in mice. *Hepatology* 1997; 26:1499-1505.
70. Huguet C, Gavelli A, Chieco PAHJ, Josef J.M., Jobard J, Gramaglia M. Liver Ischemia for hepatic resection: where is the limit? *Surgery* 1992; 251-259.
71. Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, Korthuis RJ. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock* 1997; 8:86-94.
72. Izumi T, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Hamanaka I, Takahashi N, Kawakami R, Li Y, Takemura G, Fujiwara H, Garbers DL, Mochizuki S, Nakao K. Blockade of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A inhibits NF-kappaB activation and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2001; 108:203-213.
73. Jaeschke H. Pathophysiology of hepatic ischemia-reperfusion injury: the role of complement activation. *Gastroenterology* 1994; 107:583-586.
74. Jaeschke H. Is anti-P-selectin therapy effective in hepatic ischemia-reperfusion injury because it inhibits neutrophil recruitment?. *Shock* 1999; 12:233-234.

75. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991; 260:G355-G362
76. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* 1993; 264:G801-G809
77. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ, Smith CW. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 1993; 17:915-923.
78. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990; 4:3355-3359.
79. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Contribution of complement-stimulated hepatic macrophages and neutrophils to endotoxin-induced liver injury in rats. *Hepatology* 1994; 19:973-979.
80. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1999; 43:860-878.
81. Kagiya A, Savage HE, Michael LH, Hanson G, Entman ML, Rossen RD. Molecular basis of complement activation in ischemic myocardium: identification of specific molecules of mitochondrial origin that bind human C1q and fix complement. *Circ Res* 1989; 64:607-615.
82. Kanzler S, Galle PR. Apoptosis and the liver. *Semin Cancer Biol* 2000; 10:173-184.

83. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Sugiyama S, Ozawa T, Takagi H. Effects of preceding ischemic time on the recovery course of energy metabolism in rat liver. *Biochem Int* 1990; 22:227-233.
84. Kohli V, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 1999; 116:168-178.
85. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 1999; 67:1099-1105.
86. Kondo T, Okamoto S, Todoroki T, Hirano T, Schildberg FW, Messmer K. Application of a novel method for subsequent evaluation of sinusoids and postsinusoidal venules after ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Eur Surg Res* 1998; 30:252-258.
87. Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology* 1992; 15:507-514.
88. Korsrud GO, Trick KD. Activities of several enzymes in serum and heparinized plasma from rats. *Clin Chim Acta* 1973; 48:311-315.
89. Kuebler WM, Parthasarathi K, Wang PM, Bhattacharya J. A novel signaling mechanism between gas and blood compartments of the lung. *J Clin Invest* 2000; 105:905-913.
90. Kupcsulik P, Stekker K, Nemeth M. Effect of ischaemia on the enzyme activity of the hepatic tissue. *Res Exp Med (Berl)* 1977; 170:259-270.

91. Kuroda T, Shiohara E, Homma T, Furukawa Y, Chiba S. Effects of leukocyte and platelet depletion on ischemia--reperfusion injury to dog pancreas. *Gastroenterology* 1994; 107:1125-1134.
92. Lalor P, Nash GB. Adhesion of flowing leucocytes to immobilized platelets. *Br J Haematol* 1995; 89:725-732.
93. Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE, Altieri DC. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* 1993; 73:1423-1434.
94. Lefer DJ, Flynn DM, Buda AJ. Effects of a monoclonal antibody directed against P-selectin after myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1996; 270:H88-H98
95. Lehmann TG, Koeppl TA, Kirschfink M, Gebhard MM, Herfarth C, Otto G, Post S. Complement inhibition by soluble complement receptor type 1 improves microcirculation after rat liver transplantation. *Transplantation* 1998; 66:717-722.
96. Lehr HA, Guhlmann A, Nolte D, Keppler D, Messmer K. Leukotrienes as mediators in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster. *J Clin Invest* 1991; 87:2036-2041.
97. Lehr HA, Olofsson AM, Carew TE, Vajkoczy P, von Andrian UH, Hubner C, Berndt MC, Steinberg D, Messmer K, Arfors KE. P-selectin mediates the interaction of circulating leukocytes with platelets and microvascular endothelium in response to oxidized lipoprotein in vivo. *Lab Invest* 1994; 71:380-386.
98. Lemasters JJ. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:327-338.

99. Lemasters JJ, Peng XX, Bachmann S, Currin RT, Gao W, Thurman RG. Dual role of Kupffer cell activation and endothelial cell damage in reperfusion injury to livers stored for transplantation surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10 Suppl 1:S84-S87
100. Leo R, Pratico D, Iuliano L, Pulcinelli FM, Ghiselli A, Pignatelli P, Colavita AR, FitzGerald GA, Violi F. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation* 1997; 95:885-891.
101. Litt MR, Jeremy RW, Weisman HF, Winkelstein JA, Becker LC. Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation* 1989; 80:1816-1827.
102. Lopez JA, Armstrong ML, Piegors DJ, Heistad DD. Effect of early and advanced atherosclerosis on vascular responses to serotonin, thromboxane A<sub>2</sub>, and ADP. *Circulation* 1989; 79:698-705.
103. Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 1993; 7:516-522.
104. Martinez-Mier G, Toledo-Pereyra LH, McDuffie E, Warner RL, Ward PA. L-Selectin and chemokine response after liver ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 2000; 93:156-162.
105. Martinez-Mier G, Toledo-Pereyra LH, McDuffie JE, Warner RL, Ward PA. P-selectin and chemokine response after liver ischemia and reperfusion. *J Am Coll Surg* 2000;191:395-402.
106. Martinez-Mier G, Toledo-Pereyra LH, Ward PA. Adhesion molecules in liver ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 2000; 94:185-194.

107. Marubayashi S, Oshiro Y, Maeda T, Fukuma K, Okada K, Hinoi T, Ikeda M, Yamada K, Itoh H, Dohi K. Protective effect of monoclonal antibodies to adhesion molecules on rat liver ischemia-reperfusion injury. *Surgery* 1997; 122:45-52.
108. Marzi I, Zhong Z, Lemasters JJ, Thurman RG. Evidence that graft survival is not related to parenchymal cell viability in rat liver transplantation. The importance of nonparenchymal cells. *Transplantation* 1989; 48:463-468.
109. Massberg S, Messmer K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 1998; 30:4217-4223.
110. Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)* 1998; 198:23-35.
111. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998; 92:507-515.
112. Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, Messmer K, Krombach F. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 1999; 94:3829-3838.
113. Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fassler R, Ruth P, Krombach F, Hofmann F. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med* 1999; 189:1255-1264.
114. May MJ GS. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 1998; 80-88.

115. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312:159-163.
116. McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc* 1987; 46:2402-2406.
117. McCuskey RS. Hepatic microvascular responses to endotoxemia and sepsis. In: *Liver microcirculation and hepatobiliary function. Progress in applied microcirculation*. Eds: Messmer K, Menger MD. Basel: Karger, 1993:76-85.
118. McEver RP. GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J Cell Biochem* 1991; 45:156-161.
119. Menger MD., Vollmar B. Glasz J. Post S. Messmer K. Microcirculatory manifestations of hepatic ischemia/reperfusion injury. In: *Liver microcirculation and hepatobiliary function. Progress in applied microcirculation*. Eds: Messmer K, Menger MD. Basel: Karger, 1993; 106-124.
120. Menger MD, Marzi I, Messmer K. In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res* 1991; 23:158-169.
121. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 1992; 263:H1901-H1906
122. Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 1999; 46 Suppl 2:1452-1457.
123. Menger MD, Sack FU, Barker JH, Feifel G, Messmer K. Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle.



- Therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution. *Res Exp Med (Berl)* 1988; 188:151-165.
124. Menger MD, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol* 1992; 263:H1892-H1900
  125. Menger MD, Vollmar B. Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation* 200; 7:291-306.
  126. Messmer K. Rheologische Grundlagen der Schocktherapie. *Internist* 1982; 445-449.
  127. Messmer K, Kreimeier U. Microcirculatory therapy in shock. *Resuscitation* 1989; 18 Suppl:S51-61.:S51-S61
  128. Messmer K, Krombach F. Microcirculation research in experimental surgery. *Chirurg* 1998; 69:333-338.
  129. Messmer K, Menger MD (eds). Liver microcirculation and hepatobiliary function. *Progress in applied microcirculation*. Basel: Karger, 1993;1-172.
  130. Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Li F, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol* 1995; 128:661-671.
  131. Natori S, Selzner M, Valentino KL, Fritz LC, Srinivasan A, Clavien PA, Gores GJ. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 1999; 68:89-96.
  132. Nicolini FA, Lee P, Malycky JL, Lefkovits J, Kottke-Marchant K, Plow EF, Topol EJ. Selective inhibition of factor Xa during thrombolytic therapy

- markedly improves coronary artery patency in a canine model of coronary thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7:39-48.
133. Nolan JP. Endotoxin, reticuloendothelial function, and liver injury. *Hepatology* 1981; 1:458-465.
  134. Nolte D, Hecht R, Schmid P, Botzlar A, Menger MD, Neumueller C, Sinowatz F, Vestweber D, Messmer K. Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model of BALB/C mice. *Am J Physiol* 1994; 267:H1320-H1328
  135. Nolte D, Menger MD, Messmer K. Microcirculatory models of ischaemia-reperfusion in skin and striated muscle. *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15 Suppl 1:9-16.
  136. Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15:244-249.
  137. Norman KE, Moore KL, McEver RP, Ley K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 1995; 86:4417-4421.
  138. Nunes G, Blaisdell FW, Margaretten W. Mechanism of hepatic dysfunction following shock and trauma. *Arch Surg* 1970; 100:546-556.
  139. Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, del Zoppo GJ. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 1994; 25:1847-1853.
  140. Okada Y, Marchevsky AM, Zuo XJ, Pass JA, Kass RM, Matloff JM, Jordan SC. Accumulation of platelets in rat syngeneic lung transplants: a potential factor

- responsible for preservation-reperfusion injury. *Transplantation* 1997; 64:801-806.
141. Pachter HL, Spencer FC, Hofstetter SR, Liang HG, Coppa GF. Significant trends in the treatment of hepatic trauma. Experience with 411 injuries. *Ann Surg* 1992; 215:492-500.
  142. Page CP. Platelets as inflammatory cells. *Immunopharmacology* 1989; 17:51-59.
  143. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992; 359:848-851.
  144. Parks DA, Granger DN. Ischemia-reperfusion injury: a radical view. *Hepatology* 1988; 8:680-682.
  145. Paul A, Wilson S, Belham CM, Robinson CJ, Scott PH, Gould GW, Plevin R. Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal* 1997; 9:403-410.
  146. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, Sasaki T, Sollinger HW, Belzer FO, Kalayoglu M. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation - a multivariate analysis. *Transplantation* 1993; 55:807-813.
  147. Post S, Palma P, Rentsch M, Gonzalez AP, Menger MD. Differential impact of Carolina rinse and University of Wisconsin solutions on microcirculation, leukocyte adhesion, Kupffer cell activity and biliary excretion after liver transplantation. *Hepatology* 1993; 18:1490-1497.

148. Rauén U, Elling B, Gizewski ER, Korth HG, Sustmann R, de Groot H. Involvement of reactive oxygen species in the preservation injury to cultured liver endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1997; 22:17-24.
149. Rauén U, Reuters I, Fuchs A, de Groot H. Oxygen-free radical-mediated injury to cultured rat hepatocytes during cold incubation in preservation solutions. *Hepatology* 1997; 26:351-357.
150. Rentsch M, Post S, Palma P, Lang G, Menger MD, Messmer K. Anti-ICAM-1 blockade reduces postsinusoidal WBC adherence following cold ischemia and reperfusion, but does not improve early graft function in rat liver transplantation. *J Hepatol* 2000; 32:821-828.
151. Rinder CS, Rinder HM, Smith BR, Fitch JC, Smith MJ, Tracey JB, Matis LA, Squinto SP, Rollins SA. Blockade of C5a and C5b-9 generation inhibits leukocyte and platelet activation during extracorporeal circulation. *J Clin Invest* 1995; 96:1564-1572.
152. Rossen RD, Michael LH, Kagiyaama A, Savage HE, Hanson G, Reisberg MA, Moake JN, Kim SH, Self D, Weakley S. Mechanism of complement activation after coronary artery occlusion: evidence that myocardial ischemia in dogs causes release of constituents of myocardial subcellular origin that complex with human C1q in vivo. *Circ Res* 1988; 62:572-584.
153. Roy RS, McCord JM. Superoxide and ischemia: conversion of xanthine dehydrogenase to xantine oxidase. In: *Oxy radicals and their scavenger systems*. Ed: Cohen G. New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1983:145-53.
154. Ruf A, Patscheke H. Platelet-induced neutrophil activation: platelet-expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11C/CD18. *Br J Haematol* 1995; 90:791-796.

155. Ruf A, Schlenk RF, Maras A, Morgenstern E, Patscheke H. Contact-induced neutrophil activation by platelets in human cell suspensions and whole blood. *Blood* 1992; 80:1238-1246.
156. Ruggeri ZM. Cell adhesion in vascular biology. *J Clin Invest* 1997; 41-46.
157. Ruggeri ZM, De Marco L, Gatti L, Bader R, Montgomery RR. Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor. *J Clin Invest* 1983; 72:1-12.
158. Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF. Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1997; 45:505-513.
159. Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 1993; 75:1179-1186.
160. Sawaya DEJ, Zibari GB, Minardi A, Bilton B, Burney D, Granger DN, McDonald JC, Brown M. P-selectin contributes to the initial recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion. *Shock* 1999; 12:227-232.
161. Scalia R, Armstead VE, Minchenko AG, Lefer AM. Essential role of P-selectin in the initiation of the inflammatory response induced by hemorrhage and reinfusion. *J Exp Med* 1999; 189:931-938.
162. Schlossberg H, Zhang Y, Dudus L, Engelhardt JF. Expression of c-fos and c-jun during hepatocellular remodeling following ischemia/reperfusion in mouse liver. *Hepatology* 1996; 23:1546-1555.

163. Schneider PD, Gorschboth CM. Limiting ischemic liver injury by interfering with lysosomal autophagy. *J Surg Res* 1983; 34:550-554.
164. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Riehemann K, Wesselborg S. Regulation of NF-kappa B activation by MAP kinase cascades. *Immunobiology* 1997; 198:35-49.
165. Scoazec JY, Borghi-Scoazec G, Durand F, Bernuau J, Pham BN, Belghiti J, Feldmann G, Degott C. Complement activation after ischemia-reperfusion in human liver allografts: incidence and pathophysiological relevance. *Gastroenterology* 1997; 112:908-918.
166. Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA. Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 2000; 118:183-191.
167. Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA. Synergism between platelets and leukocytes in inducing endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver: a Kupffer cell-mediated injury. *FASEB J* 2001; 15:1230-1232.
168. Singh I, Zibari GB, Zizzi H, Granger DN, Cruz L, Gonsales E, McDonald JC, Brown MF. Anti-P-selectin antibody protects against hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 1998; 30:2324-2326.
169. Stancovski I, Baltimore D. NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? *Cell* 1997; 91:299-302.
170. Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385:290-298.

171. Steinbauer M, Harris AG, Messmer K. Effects of dextran on microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle. *Am J Physiol* 1997; 272:H1710-H1716
172. Stel HV, Sakariassen KS, de Groot PG, van Mourik JA, Sixma JJ. Von Willebrand factor in the vessel wall mediates platelet adherence. *Blood* 1985; 65:85-90.
173. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 1985; 101:880-886.
174. Straatsburg IH, Boermeester MA, Wolbink GJ, van Gulik TM, Gouma DJ, Frederiks WM, Hack CE. Complement activation induced by ischemia-reperfusion in humans: a study in patients undergoing partial hepatectomy. *J Hepatol* 2000; 32:783-791.
175. Suzuki H, Abe K, Tojo SJ, Kitagawa H, Kimura K, Mizugaki M, Itoyama Y. Reduction of ischemic brain injury by anti-P-selectin monoclonal antibody after permanent middle cerebral artery occlusion in rat. *Neurol Res* 1999; 21:269-276.
176. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest* 1997; 99:2682-2690.
177. Tangelder GJ, Slaaf DW, Arts T, Reneman RS. Wall shear rate in arterioles in vivo: least estimates from platelet velocity profiles. *Am J Physiol* 1988; 254:H1059-H1064

178. Veihelmann A, Landes J, Hofbauer A, Dorger M, Refior HJ, Messmer K, Krombach F. Exacerbation of antigen-induced arthritis in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *Arthritis Rheum* 2001; 44:1420-1427.
179. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 1994; 145:1421-1431.
180. Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 1995; 117:195-200.
181. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1994; 267:G786-G793.
182. Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1996; 270:G798-G803.
183. Wanner GA, Ertel W, Müller P, Hofer Y, Leiderer R, Menger MD, Messmer K. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 1996; 5:34-40.
184. Westermann S, Vollmar B, Thorlacijs H, Menger MD. Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery* 1999; 126:881-889.
185. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, Prescott SM, Zimmerman GA. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* 1996; 97:1525-1534.



186. Woldhuis B, Tangelder GJ, Slaaf DW, Reneman RS. Concentration profile of blood platelets differs in arterioles and venules. *Am J Physiol* 1992; 262:H1217-H1223
187. Wu AH. Cardiac markers: from enzymes to proteins, diagnosis to prognosis, laboratory to bedside. *Ann Clin Lab Sci* 1999; 29:18-23.
188. Yadav SS, Howell DN, Gao W, Steeber DA, Harland RC, Clavien PA. L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am J Physiol* 1998; 275:G1341-G1352
189. Yadav SS, Howell DN, Steeber DA, Harland RC, Tedder TF, Clavien PA. P-Selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic mouse liver. *Hepatology* 1999; 29:1494-1502.
190. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999; 30:1223-1231.
191. Yamamoto S, Tanabe M, Wakabayashi G, Shimazu M, Matsumoto K, Kitajima M. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. *J Surg Res* 2001; 99:134-141.
192. Yeo EL, Sheppard JA, Feuerstein IA. Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model). *Blood* 1994; 83:2498-2507.
193. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 1997; 91:243-252.

194. Zeintl H, Sack FU, Intaglietta M, Messmer K. Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 1989; 8:293-302.
195. Zibari GB, Brown MF, Burney DL, Granger N, McDonald JC. Role of P-selectin in the recruitment of leukocytes in mouse liver exposed to ischemia and reperfusion. *Transplant Proc* 1998; 30:2327-2330.
196. Zwacka RM, Zhang Y, Zhou W, Halldorson J, Engelhardt JF. Ischemia/reperfusion injury in the liver of BALB/c mice activates AP-1 and nuclear factor kappaB independently of IkappaB degradation. *Hepatology* 1998; 28:1022-1030.

## 9. DANKSAGUNG

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. Konrad Meßmer, Direktor des Instituts für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München. Durch die freundliche Aufnahme in sein Institut ermöglichte er mir die Durchführung der Experimente in einer kooperativen und professionellen Atmosphäre, und unterstützte meine Arbeit wissenschaftlich und persönlich. Durch seine väterliche Ausstrahlung und seinen persönlichen Einsatz bei dieser Arbeit war er für mich ein motivierender und vorbildlicher Lehrer. Seine fachliche Kompetenz und seine herausragenden menschlichen Qualitäten haben mich tief beeindruckt.

Besonders danke ich Herrn Prof. med. vet. Dr. Fritz Krombach, der mich in seine Arbeitsgruppe aufnahm. Unter seiner Anleitung lernte ich wissenschaftliches Arbeiten, von der Planung und Durchführung der Experimente bis hin zur kritischen Interpretation, Diskussion und Präsentation der Ergebnisse. Seinen umfassenden Fachkenntnissen, guten Ideen und kritischen Anmerkungen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besondere Anerkennung schulde ich ihm für die fast grenzenlose Geduld bei der Durchsicht der Arbeit.

Herr Dr. Peter Biberthaler führte mich mit großer Hingabe und Geduld in die wissenschaftliche Arbeit ein. Seine Kompetenz und sein unermüdlicher Einsatz für das Gelingen der experimentellen Arbeit werden mir stets in bester Erinnerung bleiben. Durch ihn lernte ich Beharrlichkeit beim Verfolgen eines Zieles, selbst wenn damit Unbequemlichkeiten verbunden waren. Ich danke ihm besonders für die bis heute andauernde freundschaftliche Verbundenheit.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Siess bin ich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg Nr. 438 "Vaskuläre Biologie in der Medizin" der Deutschen Forschungsgemeinschaft zu großem Dank verpflichtet. Ohne die bei den regelmäßigen Seminaren und intensiven Diskussionen mit Kollegiaten gewonnenen Kenntnisse, Anregungen und Initiativen wäre die Durchführung dieser Arbeit kaum möglich gewesen.

Ebenso danke ich sehr herzlich meinen Kollegen Dr. Jürgen Landes, Dr. Stefan Langer und Ernst von Dobschütz sowie insbesondere Herrn Prof. Dr. Georg Enders für die ständige Bereitschaft, mir mit fruchtbaren Diskussionen, Anregungen und freundlichen Ratschlägen zur Seite stehen.

Schließlich danke ich den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Silvia Münzing und Frau Alke Schropp, die bei der Durchführung von Laborarbeiten fachkundige und engagierte Mithilfe erwiesen.

Die vorliegende Arbeit wurde finanziell unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (GRK 438)

## 10. LEBENSLAUF

**Name:** Andrej Khandoga

**Geburtsdatum:** 01.08.1974

**Geburtsort:** Mosty/Weißrußland

**Nationalität:** weißrussisch

**Familienstand:** verheiratet mit Natalia Khandoga (geb. Kondratjewa), 1 Kind

**Eltern:** Georg Khandoga, Arzt  
Maria Khandoga (geb. Samara) Biologin

**Ausbildung:**

**Schule:**  
1980-1991 in Mosty/Weißrußland  
1991 Abitur mit Auszeichnung.

**Universität:**  
09/1991 – 07/1997 Humanmedizin an der Medizinischen Universität  
Grodno/Weißrußland mit Auszeichnung

**Beruflicher Werdegang:**

8/1997-7/1998 Assistenzarzt an der Chirurgischen Klinik  
der Medizinischen Universität Grodno

27.07.1998 Facharztprüfung

8/1998 – 8/1999 Wissenschaftlicher Assistent und Chirurg an der Klinik für  
Allgemeinchirurgie der Medizinischen Universität Grodno

9/1999-7/2000 DAAD-Stipendiat am Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum  
der Universität München

Seit 8/2000 Kollegiat im Graduiertenkolleg Nr. 438 “Vaskuläre Biologie in  
der Medizin” der Deutschen Forschungsgemeinschaft am  
Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum der Universität  
München